



HAL
open science

Diffusion de sondes moléculaires mesurée par RMN à gradient de champ pulsé: Application à l'étude de l'évolution de la structure des systèmes caséiques au cours de la formation des gels

Steven Le Feunteun

► **To cite this version:**

Steven Le Feunteun. Diffusion de sondes moléculaires mesurée par RMN à gradient de champ pulsé: Application à l'étude de l'évolution de la structure des systèmes caséiques au cours de la formation des gels. Physique [physics]. Université de Nantes, 2007. Français. NNT: . tel-00347002

HAL Id: tel-00347002

<https://theses.hal.science/tel-00347002>

Submitted on 13 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Diffusion de sondes moléculaires mesurée par
RMN à gradient de champ pulsé : Application à
l'étude de l'évolution de la structure des systèmes
caséiques au cours de la formation des gels

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Physique-Chimie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Steven LE FEUNTEUN

Le 18 décembre 2007, devant le jury ci-dessous

Président M. AKOKA Serge, *professeur • Université de Nantes*
Rapporteurs M. CANET Daniel, *professeur • Université de Nancy*
M. DALGLEISH Douglas, *professeur • Université de Guelph*
Examineurs M. SOULIE Jean-Michel, *responsable thématique • SOREDAB, Rambouillet*
M. GUILLERMO Armel, *Chargé de recherche • CNRS, Grenoble*

Directeur de thèse : M. François MARIETTE, directeur de recherche • CEMAGREF de Rennes

Remerciements

Ce projet a été réalisé dans les locaux de l'équipe IRM-Food du Cemagref de Rennes. Il a fait l'objet d'une collaboration scientifique et financière entre le Cemagref et la SOREDAB (Société de REcherches et de Développement Alimentaire Bongrain) à laquelle la Région Bretagne s'est associée financièrement. Avant toute chose, je tiens donc à remercier chacune de ces parties sans lesquelles ce projet n'aurait jamais vu le jour.

Cette période de ma vie a été très heureuse, et c'est pourquoi je voudrais remercier d'ores et déjà tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin lors de ces trois années. J'ai particulièrement apprécié l'ambiance de travail et les rencontres que j'y ai faites. Cela me servira de référence dans l'avenir. Ce sont donc bien des remerciements sincères et chaleureux que j'ai le plaisir de faire.

Je tiens d'abord à remercier M. Nicolas Petit, directeur du groupement de Rennes, et M. Armel Davenel, responsable de l'unité TERE, de m'avoir accueilli dans leurs locaux et permis de réaliser cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à Messieurs les membres du jury, qui ont accepté de lire et de juger ce travail : en tant que rapporteurs, M. Douglas Dalglish et M. Daniel Canet, et en tant qu'examineurs, M. Serge Akoka, M. Jean-Michel Soulié et M. Armel Guillermo.

J'adresse mes plus vifs remerciements à François Mariette qui a dirigé ces travaux et m'a fait bénéficier de son enthousiasme à toute épreuve, de ses conseils et de sa grande curiosité scientifique. Je suis convaincu d'avoir beaucoup appris à tes côtés aussi bien scientifiquement qu'humainement. Merci sincèrement pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Je tiens à remercier M. Jean-Michel Soulié de la SOREDAB pour avoir soutenu cette étude et s'être investi dans ce projet, pour sa disponibilité, ses remarques et conseils avisés qui m'ont grandement aidé. J'en profite pour associer à ces remerciements M. Jean-Pierre Innocent pour avoir également soutenu et participé à ce projet, pour son aide et ses idées précieuses. Je souhaite remercier également M. Armel Guillermo du CEA de Grenoble pour

s'être également impliqué dans ce projet et m'avoir enseigné tant de choses sur les expériences RMN. Merci à vous pour votre sympathie et l'accueil que vous m'avez réservé lors des brefs séjours que j'ai effectués dans vos laboratoires.

Merci aussi à Sandrine Eliot-Godéreaux, Pascale Persenot et Fabien Guiter de la SOREDAB pour leur participation aux expériences et pour m'avoir appris les bases de la rhéologie et de la microscopie confocale.

Je remercie chaleureusement M. Arnaud Bondon pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'université de Rennes, pour son aide précieuse, sa disponibilité immédiate à chaque problème que j'ai rencontré face au spectromètre RMN, et pour tout ce qu'il m'a enseigné.

Merci à M. Joseph Le Lannic pour m'avoir familiarisé à la technique de Microscopie Electronique à Balayage et pour ses conseils sur la préparation délicate des échantillons.

Merci aussi à Minale Ouéthrani, qui m'a aidé dans les expériences de microscopie et de rhéologie, pour sa détermination et sa gentillesse.

Un grand merci à tous les (anciens) membres du CEMAGREF de Rennes en particulier, Mireille, Dominique, Stéphane, Marie-Christine, Yvonne, Brigitte, Amina, Tiphaine, Armel, Guylaine, Maja, Vincent, Christophe, Sylvain, David, Mélanie, Fernanda, Flore, Michelle et Jordy pour leur extrême serviabilité, leur gentillesse et leur bonne humeur quotidiennes.

Un merci particulier à Lu, Muriel, Roxane, Matthieu et François pour la bonne ambiance dans le bureau.

Merci à vous tous pour votre amitié que j'espère garder et pour tous les bons moments passés au travail et en dehors.

Merci également à ma famille et mes amis pour leur soutien, affectueux et moral et enfin à Enora pour toutes ces raisons et pour bien d'autres.

A mes grands-parents,

Liste des abréviations utilisées

PEG : PolyEthylèneGlycol

PEO : PolyEthylèneOxyde

PPCN : PhosPhoCaséinate Natif

PCC : Phosphate de Calcium Colloïdal

CMP : CaséinoMacroPeptide

GDL : Glucono- δ -Lactone

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MET : Microscopie Electronique à Transmission

RF : RadioFréquence

PFG-SE : Pulsed Field Gradient Spin Echo

PFG-STE : Pulsed Field Gradient Stimulated Echo

LED : Longitudinal Eddy current Delay

BPP-LED : Bipolar Pulse Pair - Longitudinal Eddy Current Delay

WATERGATE : WATER suppression by GrAdient-Tailored Excitation

Δ : Délai entre les deux impulsions de gradients (ms)

δ : Durée de l'impulsion de gradient (ms) (à ne pas confondre avec l'angle de perte)

g : Intensité du gradient appliqué (T/m)

D_{H_2O} : Coefficient de diffusion de l'eau ($m^2.s^{-1}$)

D_0 : Coefficient de diffusion mesuré dans H_2O ou D_2O ($m^2.s^{-1}$)

D_{PEG} : Coefficient de diffusion du PEG ($m^2.s^{-1}$)

$D_r = \frac{D_{PEG}}{D_0}$: Coefficient de diffusion réduit (ou normalisé) du PEG

D^{gel} / D^{sol} : Rapport des coefficients de diffusion d'un PEG dans le gel et dans la solution, la correction éventuelle, liée à l'ajout de GDL, est prise en compte dans D^{gel} .

G' : Module de conservation (Pa)

G'' : Module de perte (Pa)

δ : Angle de perte ($^\circ$) (à ne pas confondre avec la durée de l'impulsion de gradient)

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

Chapitre I. Etude bibliographique et Objectifs

1. Le lait, les micelles de caséines et les gels laitiers	5
1.1. Le lait	5
1.2. Les micelles de caséines.....	5
1.3. Structure des micelles de caséines.....	7
1.4. Hydratation et porosité des micelles de caséines	12
1.5. Les gels de caséines.....	13
1.5.1. <i>La coagulation présure</i>	13
1.5.2. <i>La coagulation acide</i>	18
1.5.3. <i>La coagulation mixte</i>	20
1.6. Conclusions	22
2. Utilisation de la RMN à gradient de champ pulsé pour la mesure de la diffusion.....	24
2.1. Introduction	24
2.2. Bases théoriques	25
2.3. La séquence d'écho de spin	27
2.4. Autres séquences pour la mesure d'un coefficient de diffusion.....	29
2.4.1. <i>La séquence d'écho stimulé</i>	29
2.4.2. <i>Séquences classiques pour réduire les courants de Foucault</i>	30
2.4.3. <i>Suppression du signal du solvant</i>	31
2.5. Atténuation non classique du signal RMN.....	32
2.5.1. <i>Diffusion libre et diffusion restreinte</i>	33
2.5.2. <i>Coefficient de diffusion multiple</i>	35
2.5.3. <i>Autres causes possibles</i>	37
2.6. Conclusions	38
3. La diffusion de molécules-sonde, les polyéthylèneglycols.....	40
3.1. Le polyéthylèneglycol.....	40

3.2. Effet des matrices sur la diffusion des PEGs	41
3.2.1. <i>Matrices à base de polysaccharides.....</i>	42
3.2.2. <i>Matrices protéiques.....</i>	45
3.2.3. <i>Matrices caséiques</i>	47
3.3. Analyse des données de diffusion.....	49
3.4. Conclusions	51
4. Description du projet	52
5. Références	54

Chapitre II. Matériels et Méthodes

1. Echantillons pour les expériences à l'équilibre et en continu	71
2. Les mesures de rhéologie	73
2.1. Les mesures au rhéomètre	73
2.1.1. <i>Principe</i>	73
2.1.2. <i>Conditions de mesure</i>	74
2.2. Les mesures de pénétrométrie.....	75
2.2.1. <i>Principe</i>	75
2.2.2. <i>Conditions de mesure</i>	75
3. La Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	76
4. Méthodes de mesure RMN	76
4.1. Mesures à bas champ	76
4.2. Mesures à haut champ	78
4.2.1. <i>A l'équilibre – Echantillons D₂O</i>	78
4.2.2. <i>En continu – Echantillons H₂O.....</i>	78
5. Traitement des données RMN.....	81
5.1. Effet du pH sur la diffusion des PEGs.....	81
5.2. Effet de l'acide gluconique sur la diffusion des PEGs	82
5.3. Effet de l'acide gluconique sur le traitement des données.....	82
5.3.1. <i>A l'équilibre – Echantillons D₂O</i>	83
5.3.2. <i>En continu – Echantillons H₂O.....</i>	84

Chapitre III. Effet de la Microstructure

Publication n°1:

Impact of casein gel microstructure on self-diffusion coefficient of molecular probes measured by ^1H PFG-NMR..... 89

Chapitre IV. Diffusion au cours de la coagulation présure

Publication n°2:

PFG-NMR techniques provide a new tool for continuous investigation of the evolution of the casein gel microstructure after renneting 123

Chapitre V. Diffusion au cours des coagulations acide et mixte

Publication n°3:

Effects of acidification with and without rennet on a concentrated casein system: A kinetic NMR probe diffusion study 153

Chapitre VI. Discussion générale et perspectives

1. Discussion générale.....	185
1.1. Effet de la structure des gels sur la diffusion des PEGs	186
1.2. Evolution de la diffusion des PEGs au cours de la coagulation présure	189
1.3. Evolution de la diffusion des PEGs au cours de la coagulation acide	192
1.3.1. Le PEG de 96750 g/mol	192
1.3.2. Le PEG de 620 g/mol	193
1.4. Evolution de la diffusion des PEGs au cours de la coagulation mixte.....	195
1.5. Conclusions	198

2. Perspectives	201
2.1. Choix des sondes moléculaires	201
2.2. Modélisation des données	201
2.3. Peut-on caractériser d'autres types de changements structuraux ?.....	202
2.3.1. <i>Systèmes caséiques modèles.....</i>	<i>203</i>
2.3.2. <i>Produits plus complexes.....</i>	<i>203</i>
2.4. Existe-t-il d'autres informations dans les spectres de diffusion ?.....	207
3. Conclusion générale	214
4. Références	218

Introduction

Introduction

L'exploitation des coefficients de diffusion mesurés par RMN a engendré de nombreux travaux dans le domaine de la chimie des polymères et pour la caractérisation des systèmes émulsionnés. La diffusion RMN permet d'accéder à des informations sur la microstructure et les interactions entre les différentes phases chimiques en présence. Par exemple, la caractérisation de la diffusion de solutés dans des gels connaît des applications importantes dans les procédés de séparation (chromatographie par perméation de gel), pour l'encapsulation de principes actifs ou bien encore dans les biomatériaux capables de relarguer des molécules d'intérêt thérapeutique. Dans le domaine de l'agroalimentaire les travaux sont moins nombreux, et concernent principalement la diffusion de l'eau, et depuis peu, de solutés, dans des solutions et gels de polysaccharide, d'amidon, de gélatine ou de protéines laitières.

La mobilité des molécules, caractérisée à partir du coefficient de diffusion translationnelle, est un paramètre clé de l'ensemble des opérations de transformation dans l'industrie agro-alimentaire. Au-delà des étapes d'élaboration des produits, la diffusion participe directement à la stabilité physico-chimique, microbiologique et sensorielle des produits alimentaires. Pendant longtemps, seuls deux facteurs étaient connus pour contrôler la mobilité moléculaire dans les aliments : sa teneur en eau et la température. Plus la teneur en eau est faible, plus la température est basse et plus la diffusion de l'eau et donc des solutés est lente. Néanmoins, de nombreux travaux ont montré depuis que ces phénomènes de diffusion ne peuvent pas être décrits aussi simplement.

La diffusion de l'eau et de solutés et l'identification des facteurs physiques et chimiques qui y participent ont été abordées dans la filière laitière par différents auteurs. En ce qui concerne les matrices caséiques, ces travaux ont principalement été réalisés au cours de deux thèses^{1,2}. La première¹ portait sur la diffusion de l'eau mesurée par RMN dans des concentrés de protéines laitières, afin de hiérarchiser les effets des différents constituants (eau, caséines, matières grasses, phase aqueuse.). Ce travail a montré que la diffusion de l'eau dans une matrice laitière ne pouvait pas être simplement reliée à la teneur en eau, mais que d'autres paramètres tels que les teneurs en caséines et en matière grasse, ou encore la composition de la fraction soluble devaient être pris en compte. La seconde thèse² s'est également intéressée à la diffusion de l'eau dans des solutions et gels de protéines laitières mais l'étude a également

été étendue à la diffusion de polymères de différentes tailles utilisés comme sondes. Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont notamment montré que, contrairement à la diffusion de l'eau et des petits solutés, la diffusion de solutés de grand poids moléculaire était affectée par la coagulation des micelles de caséines par la présure. La diffusion de ces solutés était fortement augmentée une fois le gel formé.

Néanmoins, les mécanismes expliquant la relation entre la diffusion de ces molécules et la structure des matrices caséiques sont encore méconnus. La coagulation acide des matrices caséiques a-t-elle le même effet ? Comment ces variations de la diffusion s'expliquent-elles ? Si diverses études ont clairement mis en évidence des effets de structure sur la diffusion de soluté, il n'existe pas d'interprétation unique permettant d'expliquer de telles données.

Ce travail vise donc à compléter cette première étude sur la diffusion de solutés dans les systèmes caséiques. Cette thèse a pour objet de mieux comprendre les phénomènes qui influencent la diffusion des solutés, et notamment la relation qui existe entre la taille des diffusants et la structure des échantillons. Pour cela, la même approche a été conservée : des molécules-sonde de différentes tailles, connues pour interagir faiblement avec les protéines, ont été utilisées dans des matrices de structures variables. Leur faible interaction avec la matrice permet de ne considérer que les effets d'obstruction, tandis que la modulation de leur taille offre la possibilité de sonder différentes échelles de la structure des matrices. Par ce biais, cette étude conserve un certain cadre général.

Ce projet de thèse a été réalisé au sein du Cemagref de Rennes, en collaboration avec la société SOREDAB (Société de REcherches et de Développement Alimentaire Bongrain). Les résultats de ce travail ont fait l'objet de trois publications qui sont présentées dans ce rapport sous forme de chapitres :

Le **Chapitre I** est une revue bibliographique présentant la matrice d'étude, la technique de mesure des coefficients de diffusion par RMN, la sonde utilisée : le polyéthylène glycol (PEG), et les principales conclusions qui ressortent des études ayant porté sur la diffusion de ces sondes moléculaires.

Le **Chapitre II** est consacré à la description des méthodes et des protocoles utilisés.

Le *Chapitre III*, qui est constitué de la **Publication n°1**, présente des mesures de coefficients de diffusion de PEGs de taille variable dans des matrices présentant des structures bien distinctes et obtenues par différents processus de coagulation.

Le *Chapitre IV* traite des évolutions des coefficients de diffusion de deux PEGs présentant un fort écart de masse moléculaire (620 et 96750 g/mol), et donc de taille, au cours de la coagulation d'une suspension de micelles de caséines par la présure (**Publication n°2**).

Le *Chapitre V* constitue une suite logique du chapitre IV puisqu'il est axé sur les évolutions de la diffusion de ces deux mêmes PEGs au cours des coagulations acide et mixte d'une suspension de micelles de caséines (**Publication n°3**).

Enfin, le *Chapitre VI* présente une discussion générale du travail ainsi que les perspectives envisagées.

Références

1. Métais, A. *Caractérisation des coefficients d'auto-diffusion de l'eau par RMN dans les gels laitiers en relation avec leur composition et leur structure*. Thesis, ENSAR, **2003**.
2. Colsenet, R. *Etude par RMN de la diffusion moléculaire : influence de la structure des protéines lactières à l'état liquide et gélifié*. Thesis, Nantes, **2005**.

Chapitre I

Etude bibliographique
et objectifs

1. Le lait, les micelles de caséines et les gels laitiers

1.1. Le lait

Le lait est un liquide biologique riche et complexe ayant une viscosité newtonienne égale à 1,5 fois celle de l'eau^{1,2}. Il est principalement constitué de protéines, de lipides, de lactose et de sels minéraux mais sa composition moyenne (**Tableau 1**) peut varier en fonction de nombreux facteurs (espèce, alimentation, stade de lactation et saison).

Constituants	Concentration (g/L)
Eau	870
Glucides (lactose)	46
Matière grasse	33-47
Protéines	32-35
- Caséines	26-28
- Protéines solubles	6
Matière saline	7

Tableau 1. Composition globale du lait de vache (Extrait de Cayot et Lorient²).

D'un point de vue physico-chimique, le lait présente la particularité d'être un milieu aqueux hétérogène contenant trois phases différentes :

- Une phase aqueuse qui est aussi appelée le lactosérum. Elle contient le lactose, les protéines solubles, une partie des sels minéraux, les vitamines hydrosolubles et d'autres composés mineurs (peptides, acides aminés, urée...).
- Une émulsion de globules gras dans la phase aqueuse présentant des diamètres d'environ 1 à 8 micromètres. Cette phase est constituée de 98.5 % de glycérides, 1 % de phospholipides et 0.5 % de substances liposolubles.
- Une phase dite micellaire qui consiste en une suspension de particules colloïdales principalement constituée par les caséines qui représentent environ 80 % des protéines du lait.

1.2. Les micelles de caséines

Il existe quatre types de caséines majoritaires, les caséines α_{s1} , α_{s2} , β , κ , et une fraction mineure correspondant aux caséines γ qui résultent de l'hydrolyse enzymatique des caséines β et α_{s1} par la plasmine (protéase alcaline du lait). Ces caséines se distinguent par le nombre de groupements phosphoséryles, par leur teneur en cystéine, par la présence ou non de

groupements glucidiques et leur caractère plus ou moins hydrophobe³. Les régions hydrophiles et hydrophobes étant nettement séparées, ces protéines possèdent un caractère amphiphile marqué⁴.

Dans le lait, 95 % des caséines sont associées sous forme d'ensembles supramoléculaires appelés micelles. Les micelles de caséines sont des particules quasiment sphériques, fortement hydratées⁵ avec un potentiel de surface d'environ -15 mV^{6,7}. Elles sont constituées de plusieurs milliers de caséines individuelles et d'environ 7% de composants salins dont principalement du phosphate et du calcium^{6,8,9}. Les principales caractéristiques moyennes des micelles de caséines sont résumées dans le **Tableau 2**.

Caractéristiques	Valeurs
Diamètre (nm)	130 - 160
Surface (cm ²)	8×10^{-10}
Volume (mL)	$2,1 \times 10^{-15}$
Voluminosité (mL/g)	4,4
Masse moléculaire (hydratée) (g.mol ⁻¹)	$1,3 \times 10^9$
Hydratation (g d'eau / g protéines)	3,7
Nombre de particule / mL de lait	$10^{14} - 10^{16}$
Potentiel de surface (mV)	-20

Tableau 2 : Caractéristiques moyennes des micelles de caséines (Extrait de McMahan et Brown⁶).

Ces données dépendent néanmoins des caractéristiques du lait, de son environnement physico-chimique comme le pH et la température et pour certaines, des méthodes de mesure utilisées (e.g. les valeurs d'hydratation, voir paragraphe 1.4). Au-delà de ces facteurs, le **Tableau 2** ne contient que des valeurs moyennes car toutes les micelles n'ont pas exactement les mêmes propriétés. Par exemple, si pour un lait dans des conditions données le diamètre moyen des micelles de caséines est voisin de 150 nm, celui d'une micelle individuelle peut être compris entre 50 et 500 nm^{6,10}. Il a également été observé que les proportions de caséine κ sont plus élevées dans les micelles de petite taille¹¹.

Mc Gann *et al.*¹² ont ainsi pu mettre en évidence l'existence d'une relation linéaire entre la richesse des micelles en caséine κ et leur rapport surface/volume. Il est aujourd'hui établi que la surface des particules est majoritairement, bien que non exclusivement, constituée de caséines κ . Il est également admis que cette couche de surface est l'une des

raisons expliquant la stabilité de la suspension colloïdale. Ceci provient principalement du fait que l'hydrolyse des caséines κ par la présure provoque l'agrégation des micelles. La partie C-terminale des caséines κ est hydrophile, flexible, chargée négativement et formerait une épaisseur hydrodynamique d'environ 7 nm en surface des particules¹³⁻¹⁵. Cette « chevelure » stabilisante empêcherait ainsi les micelles de s'agréger par l'intermédiaire de répulsions stérique et électrostatique^{9,16,17}.

La stabilité des micelles de caséines serait donc le résultat d'un équilibre entre les forces inter- et intra-micellaire : les forces répulsives (stérique et électrostatique) et les forces attractives¹⁸. Si les forces répulsives semblent avoir été identifiées, la répartition et la nature des forces maintenant la cohésion interne des particules ne sont pas totalement déterminées. Il est clairement établi que les minéraux contenus dans les micelles de caséines jouent un rôle clé dans la cohésion de l'édifice^{4,19} et il semble qu'il existe un juste équilibre entre les interactions hydrophobes et électrostatiques^{4,20}. En fait, l'identification précise des forces en jeu est directement liée à la structure interne des micelles de caséines. Ces paramètres, tout comme l'importante hydratation des micelles de caséines, sont donc des éléments clés pris en compte dans les modèles de structure micellaire.

1.3. Structure des micelles de caséines

L'organisation de la structure micellaire, la répartition de ses constituants ainsi que leur mode d'action ont fait l'objet de nombreux modèles^{2,10,17}. Parmi les structures théoriques proposées dans la littérature, deux principaux types de modèle cohabitent depuis près de quarante ans. Tous deux s'accordent sur la présence de caséines κ en surface de l'édifice et sur la participation active du phosphate de calcium colloïdal dans la structure micellaire. En revanche, l'organisation interne des particules est très différente dans ces deux types de modèle.

Les modèles proposant une structure avec des sous-unités de 15-30 nm appelées « sous-micelles » ont dominé pendant de nombreuses années^{2,9,11,13,21-23}. Un exemple illustrant ce type de modèle est présenté en **Figure 1**.

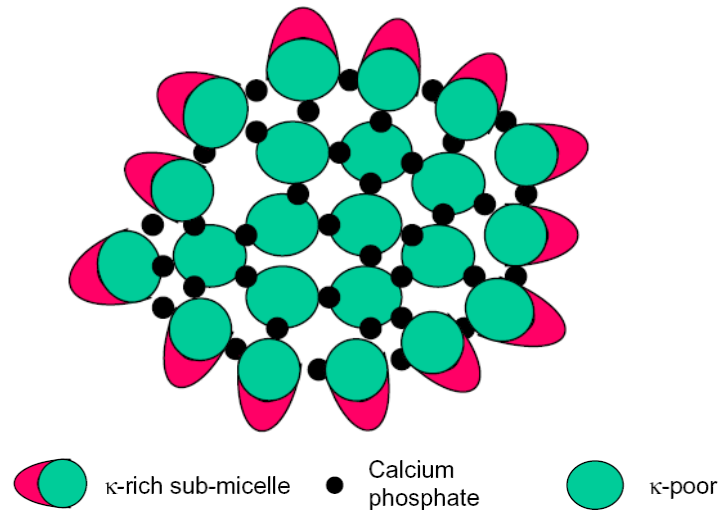


Figure 1. Représentation schématique des micelles de caséines d'après le modèle en sous-micelles (Extrait de Horne²⁴).

Ce modèle suppose que la micelle est constituée de « sous-micelles » reliées entre elles par du phosphate de calcium colloïdal. Présentant une structure de type « cœur-enveloppe », les « sous-micelles » contiendraient toutes un noyau hydrophobe mais auraient différentes compositions selon leur emplacement dans la micelle. Les « sous-micelles » les plus riches en caséine κ seraient essentiellement présentes à la surface des micelles tandis que les plus apolaires se localiseraient préférentiellement à l'intérieur de l'édifice. Il est à noter que des variantes de ce type de modèle ont été proposées, notamment par Cayot et Lorient² et Walstra²³.

La constitution des micelles en « sous-micelles » présente en effet plusieurs avantages. Cette approche permet notamment d'expliquer pourquoi les micelles de caséines se dissocient en petites unités sphériques lorsque le phosphate de calcium colloïdal est retiré de la phase micellaire^{25,26}. Entre autres, elle permet aussi d'expliquer simplement l'aspect bosselé que présentent les micelles lorsqu'elles sont observées par microscopie électronique à balayage (MEB) comme illustré en **Figure 2**. Notons toutefois que selon certains auteurs²⁴, cet aspect bosselé résulterait d'artefacts.

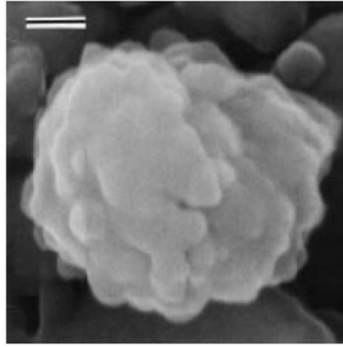


Figure 2. Image de microscopie électronique à balayage d'une micelle de caséines adsorbée sur une membrane en céramique. Grossissement $\times 70000$. Echelle = 100 nm (Extrait Mc Mahon et al.²⁷).

Le second type de modèle conçoit la micelle comme une structure ouverte et poreuse avec des régions plus ou moins denses en caséines^{16,19,24,28}. Comme illustré en **Figure 3**, dans ces modèles, les caséines sont reliées entre elles par l'intermédiaire de nano-clusters de phosphate de calcium. Le squelette des micelles serait constitué par des caséines α_s et β . Ce type d'arrangement suppose une structure flexible, plus ou moins sphérique et hautement hydratée.

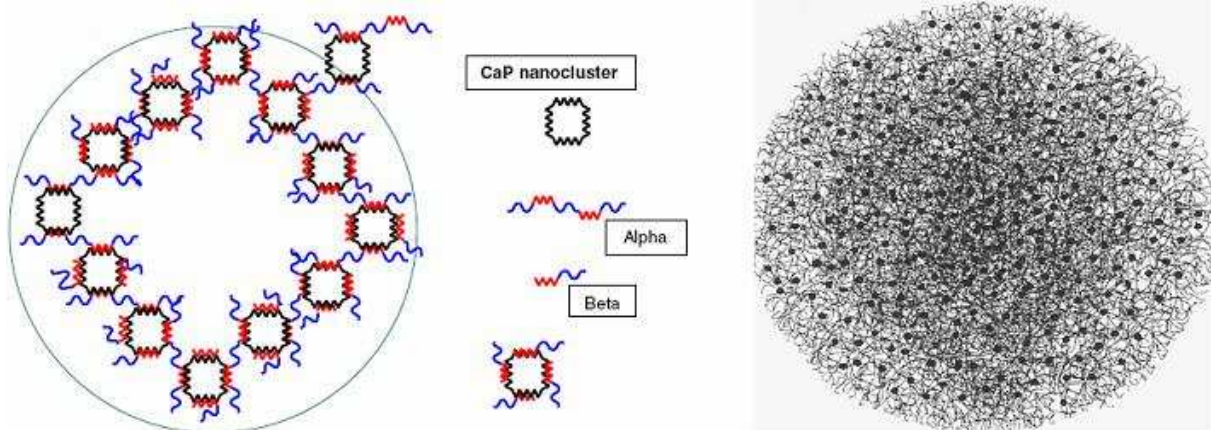


Figure 3. Modèle de micelle à structure ouverte (Extrait de Horne²⁴ et de Farrell et al.²⁹).

En cohérence avec cette vision de la micelle, Horne⁴ a imaginé un modèle où la structure interne des particules serait également formée par un squelette de caséines α_s et β (**Figure 4**). En revanche, ces protéines se relieraient entre elles, par l'intermédiaire de liaisons phosphocalciques entre les phosphoséryls des régions hydrophiles mais aussi par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. Les caséines κ se lieraient ensuite aux caséines complexées, par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. La caséine κ agirait comme un

constituant terminal de l'assemblage bloquant la croissance de la micelle, dans la mesure où cette molécule ne peut ni fixer le phosphate de calcium colloïdal, ni offrir la possibilité de créer de nouvelles liaisons de type hydrophobe.

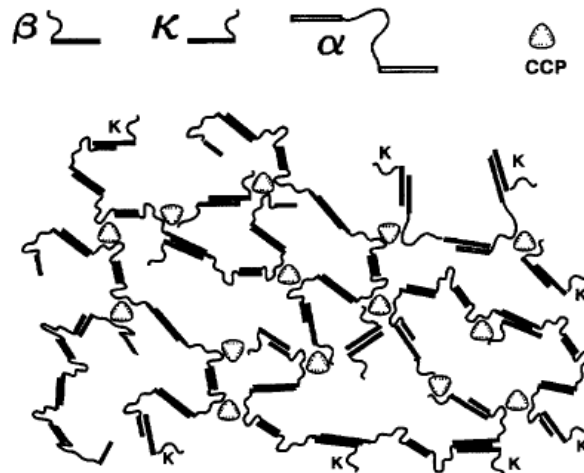


Figure 4. Modèle de la structure micellaire selon Horne⁴.

Les modèles à structure ouverte sont en bon accord avec les images des micelles obtenues par microscopie électronique à transmission (MET) (Figure 5). En effet, l'aspect bosselé n'y est pas observé tandis que l'on peut apercevoir des points noirs d'environ 2-3 nm de diamètre.

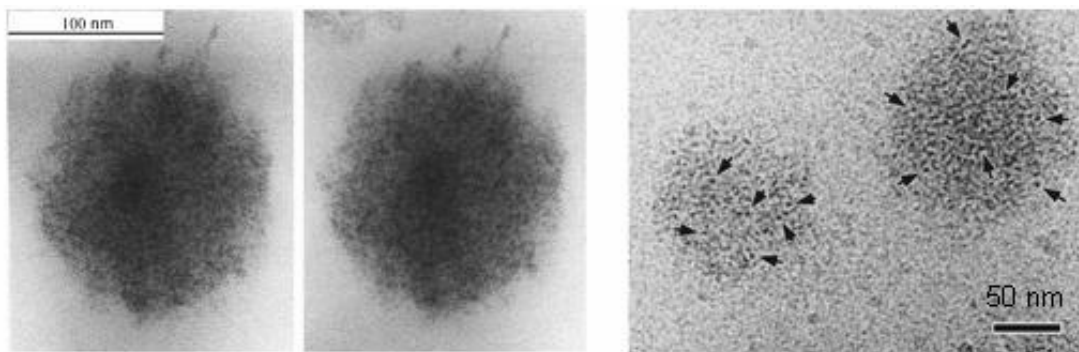


Figure 5. Images en microscopie électronique à transmission de micelles de caséines extraites de Mc Mahon et al.²⁷ (à gauche) et de Marchin et al.³⁰ (à droite).

Marchin *et al.*³⁰ ont de plus validé leurs observations microscopiques en utilisant la diffusion des rayons X aux petits angles. Ceci leur a permis de montrer que les micelles de caséines sont bien constituées de sous-unités d'environ 3 nm de diamètre et pas de sous-unités

de 15-30 nm (diamètre supposé des « sous-micelles »). Ces auteurs ont également montré qu'après solubilisation du phosphate de calcium colloïdal par acidification et par ajout d'un agent chélatant, ces « sous-unités » disparaissent. Ces « nœuds » d'environ 3 nm reflèteraient donc la présence des nanoclusters de phosphate de calcium dans la structure micellaire. Ajoutons également que le modèle de Horne⁴ a récemment permis d'expliquer pour la première fois plusieurs phénomènes concernant non seulement certaines propriétés des caséines en solution mais aussi l'influence de divers paramètres sur les propriétés physiques des gels laitiers^{20,31,32}. Si les modèles en « sous-micelles » ont longtemps dominé, les modèles à structure ouverte sont aujourd'hui les seuls à pouvoir expliquer ces récentes données expérimentales, tout en permettant de mieux comprendre certaines propriétés des particules caséiques.

Notons pour finir que Dagleish *et al.*³³ ont observé des micelles de caséines par une technique de microscopie permettant d'obtenir une très grande résolution : la microscopie électronique à balayage et à émission de champ (**Figure 6**). En dépit de cette nouvelle méthode, les « cheveux » de surface (les caséines κ) ne sont pas visibles. En revanche, ces images mettent en évidence une structure de surface bien définie.

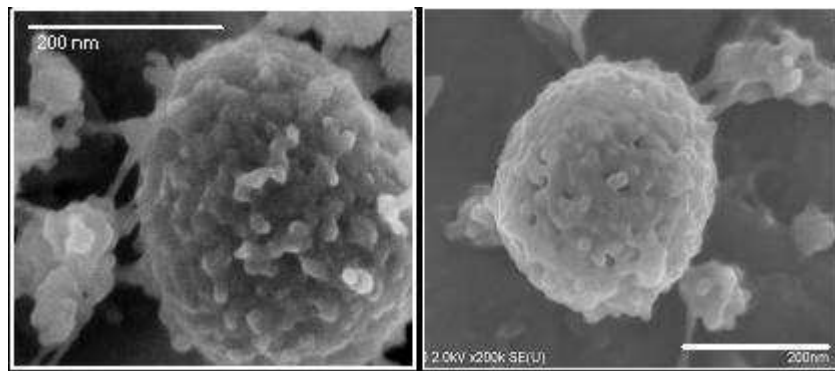


Figure 6. Images au microscope électronique à transmission et à émission de champ de micelles de caséines (Extrait de Dagleish et al.³³).

Elle apparaît comme étant formée à partir de structures cylindriques ou tubulaires, entre 10 et 20 nm de diamètre, protubérant à la surface de la micelle. Comme les images de MET (**Figure 5**), ces images montrent que les micelles de caséines ne peuvent pas être considérées comme des sphères régulières et suggèrent, en accord avec les données expérimentales, que ces particules sont très poreuses.

1.4. Hydratation et porosité des micelles de caséines

Les grandeurs habituellement employées pour caractériser la quantité d'eau présente dans les particules colloïdales sont la voluminosité (V) en mL par g de caséines (ou de protéines), et l'hydratation (H) exprimée en g d'eau par g de caséines (ou de protéines). Elles peuvent être définies par différentes techniques comme la microscopie électronique, la diffusion de lumière ou de manière plus classique par la viscosimétrie ou la centrifugation. Dans tous les cas, les valeurs obtenues se révèlent extrêmement dépendantes de la technique et des conditions expérimentales utilisées, en particulier la température^{17,34}. La large gamme de valeurs de voluminosité trouvées dans la littérature reflète donc la variété des méthodes analytiques utilisées. La relation entre la voluminosité et l'hydratation est donnée par la relation de Tanford³⁵ :

$$V = v_1 + H v_2 \quad 1$$

avec v_1 le volume spécifique partiel des protéines sèches (cm^3/g) et v_2 le volume spécifique de l'eau pure ($1 \text{ cm}^3/\text{g}$).

La microscopie électronique donne des valeurs de voluminosité de 2,1-2,2 mL/g³⁴. L'ultracentrifugation donne également de faibles valeurs d'hydratation (2,5-3 g H₂O/g)^{36,37}, en partie, probablement, parce qu'une fraction de l'eau contenue dans les micelles est éjectée sous les forces gravitationnelles élevées. Par viscosimétrie, Fox and McSweeney³⁸ ont mesuré une voluminosité de 4,4 mL/g tandis que Boulet *et al.*³⁹ ont obtenu une valeur de 6.32 mL/g. Des valeurs similaires (4 et 6 mL/g^{5,40}) ont également été déterminées par dispersion de rayons X aux petits angles et mesures de pression osmotique. Tous ces résultats montrent qu'il est difficile de connaître précisément l'hydratation des micelles de caséines, mais tous illustrent le fait que ces particules sont fortement hydratées. Ainsi, d'après les différents résultats, l'hydratation des micelles de caséines oscille entre 2,05 et 4,20 g H₂O/g et la voluminosité entre 1,25 et 6,32 mL/g.

C'est d'ailleurs cette forte hydratation, et donc la porosité des micelles, qui permet d'expliquer leur importante perméabilité aux molécules. En effet, de nombreux travaux ont montré que des molécules comme les caséines β (24000 g/mol)^{41,42} ou des enzymes comme la transglutaminase (45000 g/mol)⁴³⁻⁴⁶ peuvent entrer et sortir des micelles de caséines. Les

micelles de caséines doivent donc être considérées comme des pseudo-sphères perméables à de nombreuses molécules.

1.5. Les gels de caséines

La coagulation du lait est très utilisée par les industriels puisque celle-ci est à la base d'une multitude de produits alimentaires comme les yogourts et les fromages. La coagulation est un changement irréversible de l'état liquide du lait vers l'état gélifié. Les procédés classiques de coagulation du lait sont l'emploi d'une solution enzymatique appelée présure, l'acidification lente du milieu, et diverses combinaisons de ces deux techniques.

1.5.1. La coagulation présure

La présure est la solution enzymatique la plus couramment employée pour réaliser la coagulation du lait. Elle est sécrétée dans la caillette de veau non sevré et est composée d'un mélange de deux enzymes protéolytiques qui sont la chymosine (80%) et la pepsine (20%). Le mécanisme de coagulation du lait par la présure est caractérisé par trois phases⁴⁷ à laquelle on peut ajouter une dernière étape qui correspond à l'évolution de la structure interne du gel au cours du temps après sa formation :

- l'hydrolyse de la caséine κ
- l'agrégation des micelles de caséines
- la réticulation du gel et les réarrangements internes

1) L'hydrolyse enzymatique de la κ -caséine :

La première phase est enzymatique. Comme illustré en **Figure 7**, la chymosine hydrolyse les caséines κ au niveau de la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆, conduisant à la formation de para-caséine κ et à la libération d'un peptide nommé caséinomacropeptide (CMP).

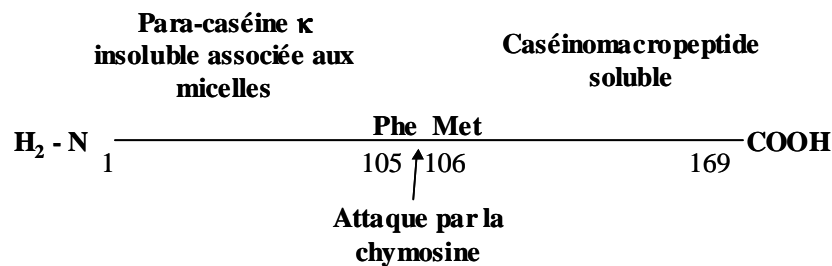


Figure 7. Représentation schématique de l'hydrolyse d'une caséine κ par la chymosine.

Le CMP est fortement chargé négativement. C'est la partie de la caséine κ qui est responsable des répulsions stériques et électrostatiques des micelles du lait. L'action de la chymosine correspond donc à une suppression de cette « chevelure » stabilisante. En conséquence, une diminution de la charge globale et de la taille des particules est observée (de 7 à 15 nm^{15,48}).

2) L'association des micelles :

Lorsque le taux d'hydrolyse moyen des caséines κ a atteint 70 à 85%, les micelles de caséines déstabilisées s'agrègent ; c'est la seconde étape. Les micelles de caséines, maintenant appelées para-micelles de caséines, adhèrent entre elles par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes au niveau des sites apolaires créés en surface.

3) La réticulation et le vieillissement du gel :

Enfin, dans la troisième étape dite de réticulation, les micelles déstabilisées et agrégées forment un réseau macroscopique qui est alors soumis à une profonde réorganisation structurale comme illustré en **Figure 8**.

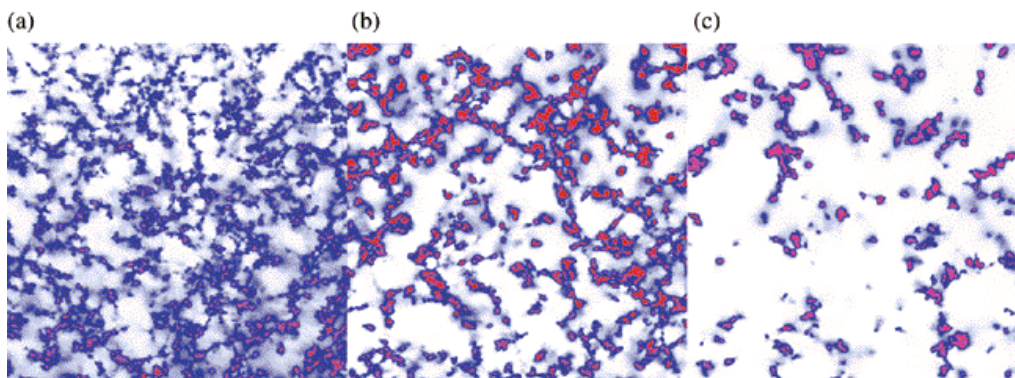


Figure 8 : Images de microscopie confocale ($90 \times 90 \mu\text{m}^2$) de gels présure de caséines à différents temps après l'addition de présure : (a) $t \sim 2\text{h}45$, (b) 5h, et (c) 22h15. Chaque image est prise dans un endroit différent du gel (Extrait de Mellema et al.⁴⁹).

Ces modifications structurales ont été observées par de nombreux auteurs⁴⁹⁻⁵⁶. Les particules caséiques, constitutives du réseau, fusionnent et se densifient. La rigidité du gel augmente et les pores du gel deviennent progressivement plus larges. En conséquence, la perméabilité du gel augmente et l'hydratation des agrégats caséiques diminue. Il se peut alors

que le gel synérèse, c'est-à-dire qu'en se contractant sur lui-même il expulse une partie de la phase aqueuse qu'il renfermait jusque-là.

Dans le souci de décrire au mieux les effets prenant place durant le vieillissement du gel, Mellema *et al.*⁵⁰ ont proposé un modèle dans lequel ils distinguent quatre niveaux de structure dans le gel présure :

- 1/ La para-micelle de caséine (le bloc élémentaire).
- 2/ Les segments rigides ou secondaires constitués des para-micelles de caséine.
- 3/ Les chaînes de segments rigides.
- 4/ Le gel au niveau macroscopique.

Cette décomposition du gel en quatre échelles de structure leur a permis de définir autant de types de réarrangements structuraux qui sont illustrés sur la **Figure 9**.

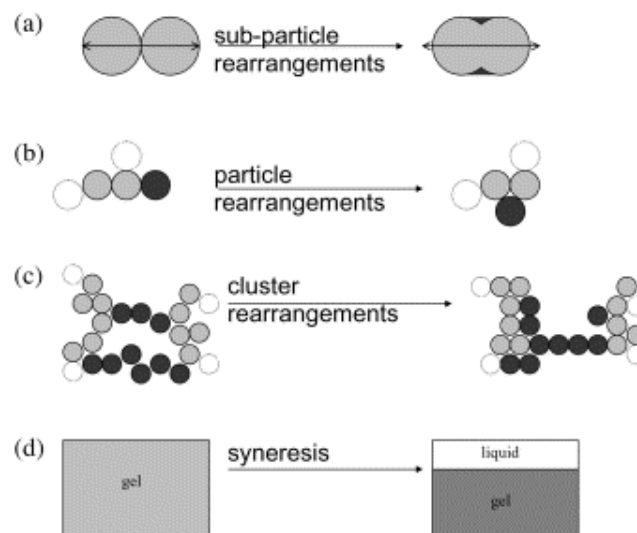


Figure 9 : Quatre type de réarrangements peuvent être distingués selon l'échelle considérée d'après Mellema *et al.*⁵⁰ : (a) les molécules ou « sous-particules » ; (b) les particules ; (c) les chaînes de particules ; (d) tout le gel.

Ces réarrangements structuraux peuvent se décrire ainsi :

- A l'échelle des particules ($< \sim 0,2 \mu\text{m}$) (**Figure 9-a**), la surface de contact des particules ou le nombre de liaisons par jonction particule-particule peut être augmenté par la fusion des particules.

- A l'échelle inter-particulaire (~0,2 à 1 μm) (**Figure 9-b**), les réarrangements impliquent des changements de position des particules et sembleraient s'initier juste après la formation du gel caséique. L'espace interstitiel entre deux groupes de particules tend à diminuer, les agrégats deviennent plus denses.

- Au niveau de la taille des agrégats, des pores ou des brins (~1 à 40 μm) (**Figure 9-c**), les réarrangements se manifestent pendant tout le processus de vieillissement. Les agrégats deviennent plus denses, les pores de plus en plus larges et les brins micellaires du réseau ont tendance à s'étirer et à devenir plus fins.

- Au niveau macroscopique (**Figure 9-d**), une contraction macroscopique du gel peut se produire en exsudant le liquide qu'il retenait jusque-là. Ce phénomène est appelé synérèse et est dû à des forces endogènes.

Cependant, bien que ce modèle soit très utile pour décrire les observations expérimentales, ces phénomènes de réarrangements ne sont pas bien compris et peu de techniques existent pour caractériser leurs dynamiques. En effet, l'intensité de ces processus est dépendante de nombreux paramètres qui sont également connus pour modifier directement la cinétique de la coagulation présure d'un lait. C'est le cas de la concentration en enzyme, de la température^{49,56,57} qui est liée à l'activité enzymatique et à la force des interactions hydrophobes, du pH^{49,58} qui affecte également l'activité enzymatique et modifie les interactions électrostatiques, ou encore de la composition du système caséique⁵⁹ (teneur en calcium, en caséines, traitement thermique préalable...). Pour illustrer l'impact que peuvent avoir ces paramètres sur les processus de réarrangements, des images prises au cours du vieillissement d'un gel présure dans différentes conditions de température et de pH sont présentées en **Figure 10**.

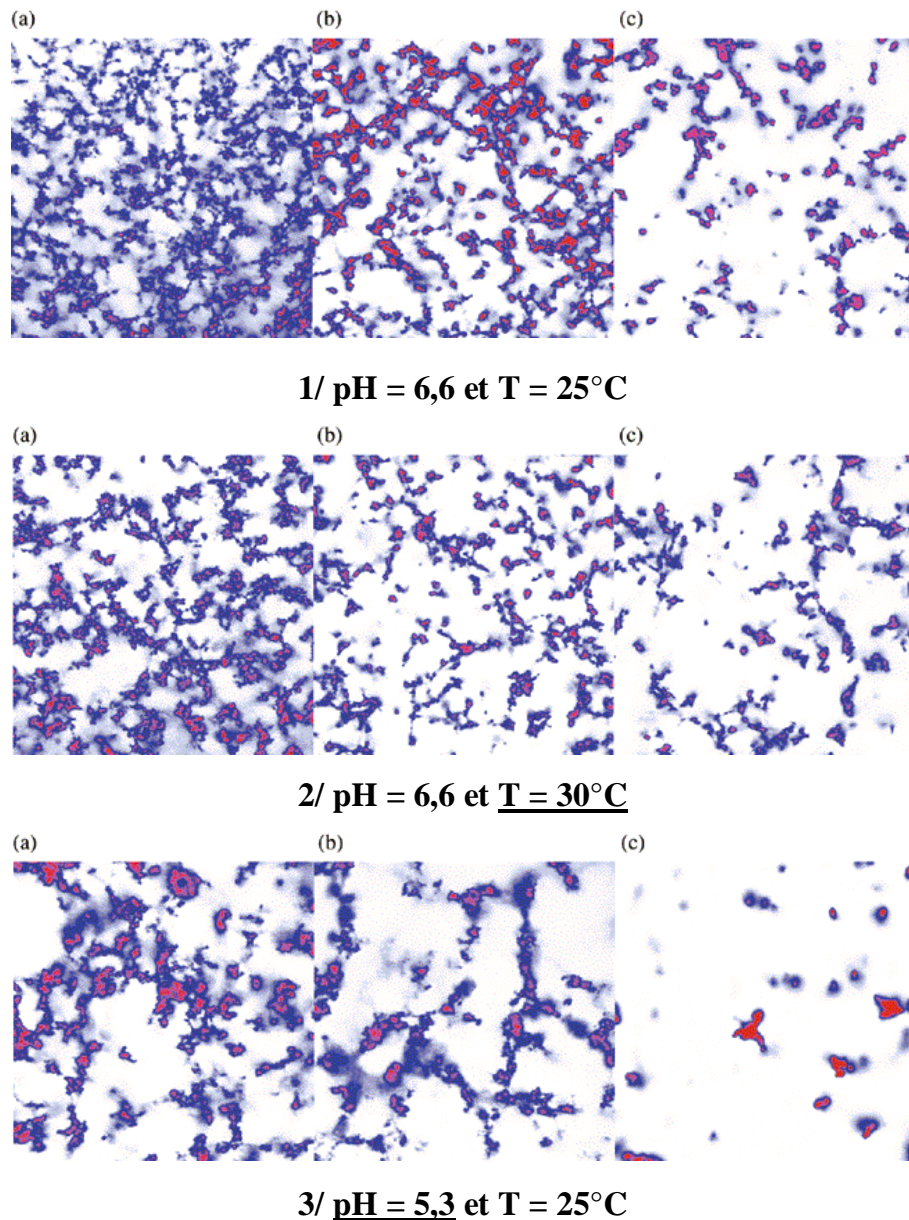


Figure 10 : Images de microscopie confocale ($90 \times 90 \mu\text{m}^2$) de gels présure obtenues dans différentes conditions de pH et de température et à différents temps après l'addition de présure : (a) $t \sim 2\text{h}45$, (b) 5h , et (c) $22\text{h}15$. (Extrait de Mellema et al⁴⁹).

Ces images montrent qu'une augmentation de la température ou qu'une baisse du pH à l'emprésurage accroît l'intensité des réarrangements structuraux. De tels changements de conditions sont aussi connus pour accélérer la formation du gel : plus la gélification du système est rapide et plus les réarrangements structuraux semblent importants. Bien que le mécanisme de coagulation reste le même, il existe ainsi une grande variété de gels pouvant être formés par coagulation présure.

1.5.2. La coagulation acide

La micelle de caséine est stable au pH normal du lait et à température ambiante mais l'acidification du lait peut conduire à différents résultats suivant les conditions utilisées. Si elle est rapide, induite par addition d'un acide minéral ou organique tels que les acides citrique ou lactique, la phase protéique se sépare du lactosérum. En revanche, au cours d'une acidification lente, les micelles de caséines deviennent progressivement instables et conduisent à la formation d'un coagulum acide. Nous ne présenterons ci-après que le cas d'une acidification lente puisque c'est celle-ci qui est utilisée pour former les gels acides. L'acidification est classiquement réalisée par des bactéries lactiques qui métabolisent le lactose et sécrètent de l'acide lactique. On peut également utiliser un acidogène comme la glucono- δ -lactone (ou GDL) qui, une fois parfaitement répartie dans le milieu, va lentement s'hydrolyser et libérer de l'acide gluconique.

L'acidification du lait induit de nombreux changements des propriétés physico-chimiques dans la matrice. La charge des particules, leur composition minérale et protéique, leur hydratation et donc leur taille varient durant la chute du pH^{36,37,60}. Pour rendre compte de ces événements, le processus d'acidification est généralement décomposé en plusieurs intervalles de pH durant lesquels ces différents phénomènes prennent place :

1/ De pH_{initial} ~ 6.8 à pH = 6,0-5,8 : Cette phase est principalement caractérisée par un début de solubilisation du phosphate de calcium colloïdal (PCC) et par une réduction de l'hydratation des micelles de caséines. Notons également que la charge négative de surface des micelles diminue puisque le pH baisse. A la fin de cette étape, l'hydratation des micelles a diminué d'environ 15%^{36,37,60-62} causant une réduction du diamètre moyen des particules d'environ 10 nm^{15,63,64}. Ce phénomène est généralement attribué à « l'aplatissement » des caséines κ en surface des micelles par attraction électrostatique^{15,36,37,60-64}.

2/ De pH = 6,0-5,8 à 5,2-5,0 : La solubilisation du phosphate de calcium devient plus rapide et, pour un lait, à pH ~ 5,1 tout le PCC initialement contenu dans les micelles a été relargué^{36,37,41,65,66}. Compte tenu de son importance dans la structure des micelles de caséines, les particules changent nécessairement de structure interne durant cette phase. Cette étape de « transition structurale » serait d'ailleurs la cause de l'augmentation de l'hydratation qui est observée dans ce même intervalle³⁶. De plus, selon la température à laquelle l'acidification est

conduite, certaines caséines se solubilisent avant de progressivement retourner dans la phase colloïdale. Le maximum de solubilisation de ces protéines se situerait autour de pH = 5,5 à 20°C et est également attribué aux modifications structurales des particules^{36,37,65}. Malgré tous ces événements, il semble que les particules caséiques conservent leur intégrité jusqu'à pH ~ 5,2, du moins pour des matrices peu concentrées^{30,67}.

3/ De pH = 5,2-5,0 à pH ~ 4,6 : Pour du lait, la taille des agrégats augmente doucement autour de pH ~ 5,2, puis croit très rapidement à partir de pH ~ 5,0, indiquant le début de la phase d'agrégation^{15,63}. Dans le même temps l'hydratation chute de nouveau par renforcement des interactions inter-protéines jusqu'à la neutralisation globale des charges à pH ~ 4,6, c'est-à-dire au pH isoélectrique des caséines^{36,37,60-62,68}. Pour un lait écrémé à 20°C, la gélification du système intervient à pH = 4,8 environ^{37,65,69,70}. A pH = 4,6, le gel est complètement formé mais comme dans le cas des gels présure, des réarrangements structuraux se produisent et peuvent mener à la fusion des particules⁷⁰ ou à l'augmentation de la perméabilité des gels⁵¹. Cependant, les gels acides semblent moins sujets aux réarrangements que les gels présure comme l'illustre par exemple leur tendance beaucoup plus faible à synérèser⁷⁰.

Plusieurs remarques doivent être apportées à cette description de la coagulation acide. En effet, selon les techniques employées, des écarts dans les valeurs de pH peuvent être rencontrés. Par exemple, des études par diffusion multiple de la lumière ou DWS (Diffusion Wave Spectroscopy) ont montré que le diamètre moyen des particules diminuait jusqu'à pH ~ 5,5^{15,63,64}. Ces résultats suggèrent donc que le minimum local d'hydratation des micelles serait plutôt autour de cette valeur que de pH ~ 5,9 (déterminé par ultracentrifugation). En fait, de tels écarts dans les valeurs de pH sont à relativiser pour deux raisons principales. Premièrement, les micelles de caséines réagissent à la chute du pH avec leur propre dynamique. Ainsi, des résultats différents sont obtenus selon que l'expérience est réalisée de façon continue ou discontinue au cours de l'acidification^{71,72}. En effet, certaines techniques permettent de réaliser des suivis en dynamique tandis que d'autres ne peuvent être menées qu'à l'équilibre.

Deuxièmement, de nombreux paramètres peuvent déplacer le déroulement de ces événements vers des intervalles de pH différents. C'est par exemple le cas de la vitesse

d'acidification^{62,66,73}, de la concentration en caséine^{37,74}, de la composition de la phase aqueuse^{36,75-77} ou du traitement thermique préalable du lait. En guise d'exemple, Gastaldi *et al.*³⁷ ont montré que la concentration en caséines affecte le pH de gélification, la solubilisation du phosphate de calcium colloïdale, le pouvoir tampon du lait, la dissociation des caséines et l'hydratation des micelles. Pour illustrer ceci, l'effet de la concentration en caséines sur l'évolution de l'hydratation des micelles et la solubilisation des caséines au cours d'une acidification sont présentés en **Figure 11**.

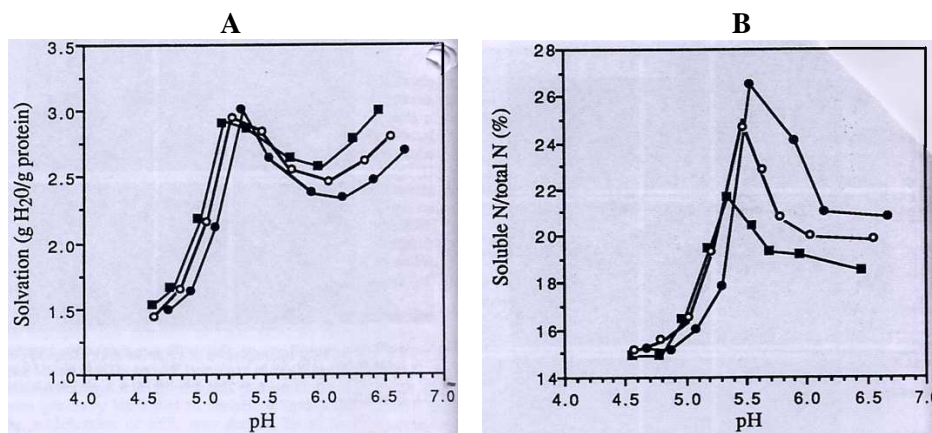


Figure 11 : Effet de la concentration en caséines sur (A) l'hydratation des micelles de caséines et (B) la solubilisation des caséines pendant l'acidification d'un système caséique. ● : 10%, ○ : 15% et ■ : 20% de matière sèche (Extrait de Gastaldi *et al.*³⁷).

Ces résultats montrent que l'augmentation de la matière sèche de 10 % à 20% modifie les valeurs du minimum local d'hydratation (de 2,35 à 2,59 g H₂O / g protéines), la quantité maximale de caséines solubilisées (de 26,54 à 21,70 %), et déplace aussi ces évènements vers des pH plus acides. En effet, le minimum local d'hydratation et le maximum de pouvoir tampon étaient respectivement déplacés de pH = 6,14 à 5,93 et de pH = 5,30 à 5,17.

1.5.3. La coagulation mixte

Un grand nombre de fromages est issu de la coagulation « mixte » du lait, coagulation qui résulte de l'action conjuguée d'un agent acidifiant et de la chymosine, de manière séquentielle ou concomitante. La multiplicité des combinaisons conduisant à des états d'équilibres spécifiques est à l'origine de l'extrême diversité des fromages.

Curieusement, assez peu d'études ont été réalisées sur l'action conjointe d'une acidification et d'une action enzymatique^{54,78-82}. Néanmoins, celles-ci nous renseignent sur les

mécanismes conduisant à la formation de ces gels et sur leurs propriétés physiques. L'action de la présure étant généralement plus rapide que celle de l'acidification, ce type de gel se forme le plus souvent en deux étapes. Pendant la première, alors que l'acidification est déjà commencée, l'action enzymatique induit la formation d'un gel à fort « caractère » présure. L'acidification se poursuit et autour de $\text{pH} \sim 5,0$, lorsque le phosphate de calcium est totalement solubilisé, les propriétés macroscopiques du gel changent. C'est la seconde étape qui se caractérise par l'évolution progressive de certaines propriétés du gel à fort « caractère » présure vers celle d'un gel à « caractère » acide plus prononcé^{78,79}. En cohérence avec les résultats d'autres auteurs^{53,79}, Tranchant *et al.*⁷⁸ ont illustré ce phénomène en représentant schématiquement les évolutions du module de conservation (G') et du facteur de perte ($\text{Tan } \delta$), qui caractérisent les propriétés physiques des gels, lorsqu'un lait écrémé reconstitué (9% de matière sèche) est acidifié par des bactéries lactiques à 40°C (**Figure 12**).

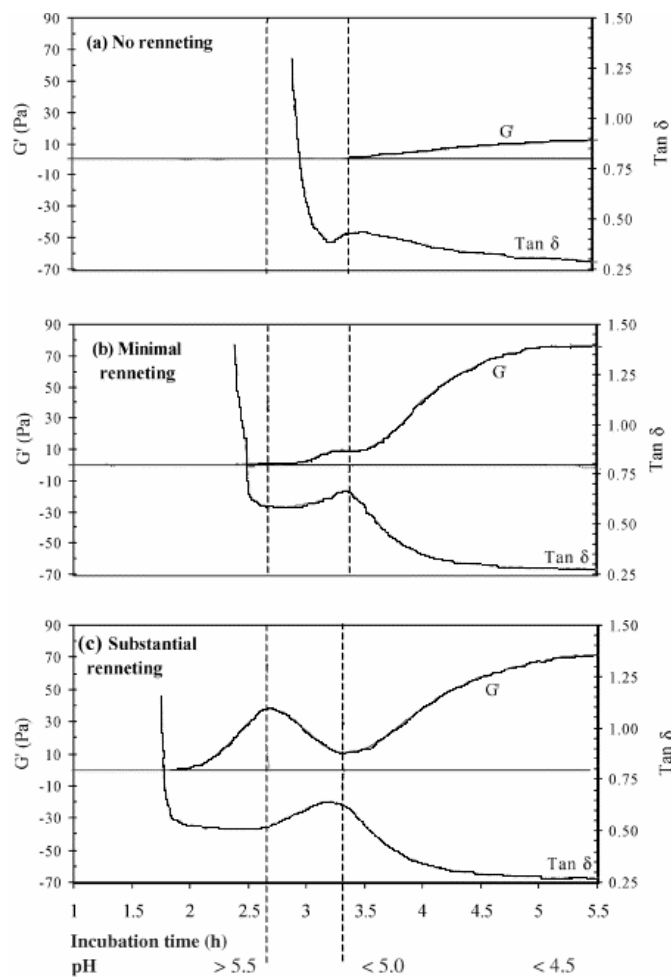


Figure 12 : Schéma de l'évolution du module de conservation (G') et du facteur de perte ($\text{tan } \delta = G''/G'$) en fonction du temps d'incubation et du pH. (a) sans présure, (b) avec peu de présure et (c) avec beaucoup de présure (Extrait de Tranchant *et al.*⁷⁸).

Plus la quantité d'enzyme ajoutée est importante (**Figure 12-a** < **Figure 12-b** < **Figure 12-c**), et plus le facteur de perte ($\tan \delta$) chute tôt. La première chute observable dans les **Figure 12-b** et **Figure 12-c** indique la formation d'un gel à fort « caractère » présure. La seconde chute, autour de $\text{pH} \sim 5,0$, illustre quant à elle l'effet de l'acidification. On remarquera que les gels finaux présentent un facteur de perte (qui traduit l'élasticité d'un gel) proche de ceux des gels acides, alors que le module de conservation (qui traduit la rigidité du gel) est plus proche de celui d'un gel présure. Ces gels n'ont donc pas exactement des propriétés intermédiaires entre celles d'un coagulum acide et présure mais plutôt une combinaison de ces dernières. Ces caractéristiques démontrent ainsi que les gels mixtes ont leurs propres spécificités.

Comme les gels présures, les gels mixtes ont une forte tendance à synérèser^{76,83} et leur microstructure est profondément remodelée pendant le vieillissement du gel. Les propriétés physiques et rhéologiques de ces gels sont donc également sensibles à de nombreux paramètres. Il a ainsi été montré que la perméabilité des gels augmente avec la concentration en enzyme^{54,79} et avec la température de coagulation sur une gamme de 22 à 32°C⁸⁴. De même, le traitement thermique d'un lait écrémé change fortement la perméabilité des gels obtenus⁵⁴. Bien que peu d'études aient réellement été dédiées à ces phénomènes dans les gels mixtes, tous les résultats obtenus montrent une très forte similarité avec ceux qui sont observés pendant le vieillissement des gels présure. Néanmoins, pour des conditions similaires, il semble que ces phénomènes soient plus intenses dans le cas des gels mixtes à cause de la diminution concomitante du pH ^{54,83}. En effet, la plupart des auteurs ayant étudié l'action cumulée d'une action enzymatique et d'une baisse du pH rapportent que les gels formés sont en général constitués de pores plus larges et d'agrégats plus fusionnés^{53,54,78,82,83,85}.

1.6. Conclusions

Les micelles de caséines sont des édifices macromoléculaires poreux et fortement hydratés ayant une structure et des propriétés complexes. Elles peuvent être coagulées par l'action d'une enzyme, par une acidification lente du milieu et par diverses combinaisons de ces deux processus. Il existe une grande diversité de gels qui peuvent être formés en termes de propriétés et de microstructure car celles-ci dépendent non seulement du type de coagulation

utilisé mais aussi de nombreuses conditions environnementales. Ceci s'explique principalement par le fait que la structure des micelles de caséines repose sur de nombreux équilibres physico-chimiques. Elles sont donc très sensibles à leur environnement, et « réagissent » aux changements des conditions du milieu avec leur propre dynamique.

C'est d'ailleurs ces « cinétiques de réaction » qui permettent d'expliquer la complexité des mécanismes de coagulation, l'occurrence des réarrangements structuraux dans les heures et les jours qui suivent la formation d'un gel, ou encore certaines divergences dans les résultats qui sont obtenus avec différents outils. En effet, de nombreuses techniques peuvent être utilisées pour étudier la coagulation des matrices laitières mais toutes présentent des limites. Beaucoup de techniques sont invasives et ne permettent donc pas de réaliser des études « en dynamique » (microscopie, perméamétrie, ultracentrifugation...). De plus, ces dernières nécessitent très souvent un traitement drastique de l'échantillon (centrifugation, séchage...). D'autres techniques sont non invasives et peuvent pour certaines être réalisées de manière continue mais la plupart d'entre elles ne sont pas adaptées aux systèmes concentrés comme les techniques de diffusion ou diffraction d'ondes électromagnétiques (e.g. diffusion multiple de la lumière, mesures de turbidité, diffraction des rayons X...). Les techniques de rhéométrie restent sans doute les plus utilisées car elles permettent d'étudier les processus de coagulation en continu quelles que soient la concentration et la composition de la matrice initiale. Néanmoins, ces dernières ne procurent que des informations sur les propriétés macroscopiques des systèmes. L'interprétation des résultats obtenus en termes de mécanismes internes à l'échantillon dépend donc des autres techniques.

Les techniques RMN possèdent les avantages d'être non-invasives mais aussi, contrairement à la plupart des techniques couramment utilisées, d'être adaptées aux échantillons concentrés. Les techniques de relaxation ont par exemple montré que la solubilisation du phosphate de calcium au cours de l'acidification et que la quantité de sérum expulsée au cours de la synérèse de gels pouvaient être mesurées de façon continue⁸⁶. L'outil RMN semble ainsi posséder des atouts pour caractériser certains phénomènes qui se déroulent durant les processus de coagulation des matrices laitières, notamment lorsque celles-ci sont concentrées.

2. Utilisation de la RMN à gradient de champ pulsé pour la mesure de la diffusion

2.1. Introduction

La diffusion est le transport spontané de matière, c'est-à-dire sans force extérieure, d'une quantité caractérisée par une densité locale conduisant à l'uniformisation spatiale de sa distribution. La diffusion translationnelle est la forme la plus essentielle de transport et tend à réduire à l'intérieur d'un système les gradients de température, de pression, de potentiel ou l'action de forces extérieures. Elle est également responsable de toutes les réactions chimiques puisque toutes les espèces réactives doivent rentrer en collision avant de pouvoir réagir. A l'échelle microscopique, ce mouvement des molécules est connu sous le nom de Brownien.

Dans les systèmes équilibrés, il n'y a pas de variation de volume ni de transfert de masse mais les molécules restent néanmoins en mouvement. Le coefficient dit d'auto-diffusion permet de mesurer la mobilité de ces molécules. L'auto-diffusion est un mouvement translationnel aléatoire conduit par l'énergie interne du système et dépend notamment de la taille du diffusant et de la température. Elle peut être décrite par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k T}{f} \quad 2$$

où D est le coefficient de diffusion, k la constante de Boltzman, T la température et f le coefficient de friction. Dans le cas d'une particule sphérique avec un rayon effectif hydrodynamique R_h dans une solution de viscosité η l'équation s'écrit :

$$D = \frac{k T}{6 \pi \eta R_h} \quad 3$$

Cependant les formes des molécules sont généralement plus complexes, et des interactions spécifiques entre molécules ne peuvent souvent pas être négligées, ce qui modifie l'expression du coefficient de friction. De même, lorsque les mouvements de la molécule s'opèrent dans une géométrie confinée ou anisotrope, les chemins possibles à la diffusion dépendent de la topologie de la matrice. Par conséquent, la diffusion moléculaire peut aussi

contenir des informations sur la structure environnante (forme, taille et orientation) mais dans de tels cas, l'approche analytique peut devenir mathématiquement très difficile⁸⁷⁻⁹⁰.

Par sa nature non destructive et non invasive la spectroscopie Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est un outil unique pour l'étude de la dynamique moléculaire dans les systèmes biologiques et chimiques. Dès les premières expérimentations en 1950, Hahn⁹¹ a en effet montré que l'amplitude de l'écho de spin est influencée par la diffusion moléculaire en raison des fluctuations du champ magnétique local. Ainsi, il était possible de déterminer le coefficient d'auto-diffusion par l'application d'un gradient de champ magnétique. Les premières expériences de mesure d'auto-diffusion ont été réalisées en présence d'un champ magnétique constant par Carr et Pucell en 1954⁹². Toutefois, cette méthode présentant des limitations expérimentales, la technique employant des gradients de champ pulsé (RMN-PFG) a été introduite par Stejskal et Tanner en 1965⁹³ qui ont montré expérimentalement et théoriquement comment un coefficient d'auto-diffusion pouvait être obtenu par cette technique. De nombreuses améliorations ont depuis été apportées mais le principe de la mesure est toujours le même.

2.2. Bases théoriques

En RMN, on s'intéresse au spin des noyaux des atomes, à chacun desquels est associé un moment magnétique (i.e. une sorte de petit aimant). Ces spins sont placés dans un champ magnétique statique intense qui permet d'orienter une partie d'entre eux selon la direction du champ (on parle d'aimantation). Cette aimantation « tourne » autour de B_0 avec une fréquence qui est décrite par l'équation de Larmor :

$$\omega = \gamma(1 - \sigma) B_0 \quad 4$$

avec ω la fréquence de Larmor (en rad.s^{-1}), γ le rapport gyromagnétique ($\text{rad.T}^{-1}.\text{s}^{-1}$) (qui dépend des noyaux observés), σ une constante d'écran et B_0 (T) l'intensité du champ magnétique statique. Si B_0 est homogène dans l'espace alors ω ne dépend que de σ qui est fonction de l'environnement chimique des spins observés. Cette constante d'écran est très faible comparée à 1, aussi, les fréquences d'un même type de spins (^1H par exemple) restent proches. C'est par ce biais qu'il est possible d'obtenir des spectres RMN où chaque raie provient d'un même type de spins dans des environnements différents. Par exemple, les protons d'un $-\text{CH}_3$ et d'un $=\text{CH}_2$ auront des signaux distincts dans les spectres.

En RMN à gradient de champ pulsé, en plus de B_0 , il est possible d'appliquer un gradient de champ magnétique, g ($T.m^{-1}$), pour entraîner une dépendance spatiale de ω . En considérant que le gradient de champ magnétique est appliqué dans la direction z , et en négligeant les constantes d'écran, on obtient :

$$\omega_z = \gamma(B_0 + g_z) \quad 5$$

Un gradient de champ magnétique peut ainsi être utilisé pour marquer la position d'un spin le long d'une direction (ici z) au travers de la fréquence de Larmor. Les systèmes d'imagerie permettent d'appliquer des gradients dans les trois dimensions d'espace (x , y et z) mais la plupart des sondes conçues pour mesurer la diffusion par RMN ne fonctionnent selon qu'un seul axe. Classiquement, pour les appareils à aimant vertical, le gradient est appliqué de façon colinéaire à B_0 et la diffusion est donc mesurée selon cette direction. Cependant, dans les mesures de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé, ce n'est pas exactement la fréquence des spins qui est encodée spatialement.

L'aimantation est d'abord basculée dans le plan perpendiculaire à B_0 par une impulsion de radiofréquence (RF) à 90° . Notons par ailleurs que l'acquisition des signaux est toujours réalisée dans ce plan. Suite à cette perturbation, l'aimantation revient progressivement à l'équilibre, c'est-à-dire dans la même direction que B_0 . On dit que les spins relaxent. Il existe deux types de relaxation : la relaxation transversale (qui se réalise dans le plan perpendiculaire à B_0) et la relaxation longitudinale (qui se réalise dans l'axe du champ magnétique B_0). Les temps de relaxation transversale (T_2) et longitudinale (T_1) sont utilisés pour caractériser la vitesse avec laquelle les spins retournent à l'équilibre. Dans l'axe longitudinal, l'aimantation augmente jusqu'à recouvrer son intensité initiale tandis que dans le plan transversal, l'aimantation s'annule progressivement.

Dans les mesures de diffusion par RMN à gradient de champ pulsé, après avoir basculée l'aimantation dans le plan transversal, un gradient de champ magnétique est appliqué sous la forme d'une impulsion. En procédant ainsi, on obtient la dépendance spatiale du degré de déphasage. Dans le cas d'une cohérence à un quantum et d'une impulsion de gradient de forme carré, il est donné par :

$$\phi(t) = \underbrace{\gamma B_0 t}_{\text{champ statique}} + \underbrace{\gamma g \int_0^t z(t') dt'}_{\text{gradient appliqué}} \quad 6$$

Le degré de déphasage dû au gradient appliqué dépend donc du type de noyau (γ), de l'intensité du gradient (g), de la durée d'application du gradient (t), et du déplacement du spin le long de l'axe du gradient (z) pendant ce délai. En négligeant la durée d'application du gradient (i.e. impulsion très courte), et donc le mouvement des spins durant l'impulsion de gradient, le degré du déphasage est fonction de la position des spins le long de l'axe du gradient (axe z). C'est cette dépendance du degré de déphasage à la position des spins qui est à la base de la mesure d'un coefficient de diffusion par RMN-PFG.

2.3. La séquence d'écho de spin

La séquence d'écho de spin de Stejskal et Tanner⁹³, aussi appelée PFG-SE (Pulse Field Gradient Spin Echo), est la méthode la plus simple et la plus communément employée. Elle est présentée en **Figure 13** et se décompose comme suit : une première impulsion RF à 90° est appliquée et est suivie par une impulsion de gradient d'intensité g et de durée δ qui entraîne un déphasage progressif qui est d'intensité différente selon la position des spins dans le tube.

Une impulsion RF à 180° est ensuite appliquée afin de changer le signe du déphasage. Enfin, une seconde impulsion de gradient présentant les mêmes caractéristiques que la première est appliquée afin de refocaliser les spins. Cette refocalisation ne sera possible que si les spins n'ont pas diffusé pendant le délai séparant les deux impulsions de gradients (Δ). Dans le cas contraire, la refocalisation ne sera pas parfaite et le signal de l'écho sera atténué.

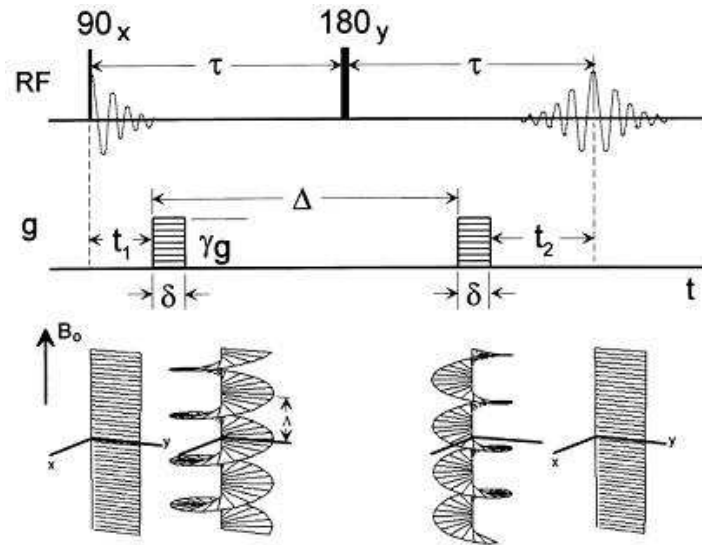


Figure 13 : Représentation schématique de la séquence de Stejskal et Tanner ou PFG-SE (Extrait de Johnson⁹⁴).

En augmentant progressivement la force des gradients (g), on obtient ainsi une série de spectres dont les signaux s'atténuent progressivement comme illustré en **Figure 14**.

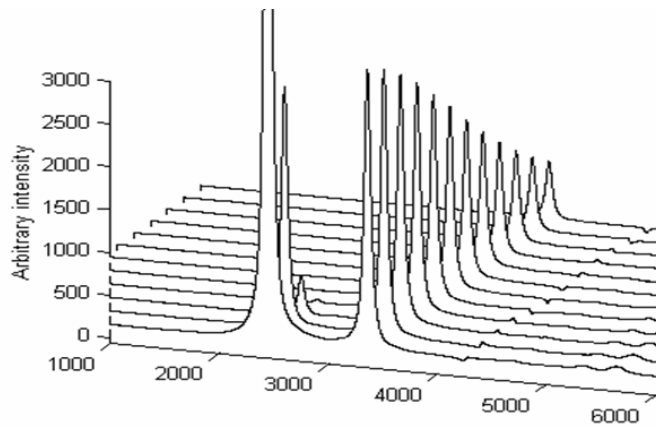


Figure 14 : Exemple de spectres obtenus lors de la mesure d'un coefficient de diffusion (Extrait de Colsenet⁹⁵).

Notons que durant toute l'expérience, les spins relaxent transversalement. Le temps de relaxation T_2 intervient donc dans l'équation décrivant le signal de l'écho de spin. En revanche, l'atténuation de l'écho est indépendante du temps de relaxation de l'espèce étudiée. En normalisant les signaux des différents échos, on obtient alors l'équation décrivant l'atténuation du signal (E)^{90,93} :

$$E = \exp\left(-\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D\right) \quad 7$$

ou

$$E = \exp(-k D) \quad 8$$

avec

$$k = \gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) \quad 9$$

On peut ainsi déterminer le coefficient de diffusion d'une molécule puisque hormis D, tous les paramètres sont connus : γ le rapport gyromagnétique, g et δ l'intensité et la durée du gradient (g), et Δ l'intervalle de diffusion. Notons également qu'en traçant $\ln(E)$ en fonction de k , on obtient une droite de pente $-D$.

2.4. Autres séquences pour la mesure d'un coefficient de diffusion

2.4.1. La séquence d'écho stimulé

La séquence d'écho stimulé, aussi appelée PFG-STE (Pulsed Field Gradient STimulated Echo) est présentée en **Figure 15**. Dans cette séquence, l'impulsion 180° entre les deux gradients est remplacée par deux impulsions 90° , l'une peu après le premier gradient et l'autre peu avant le second gradient.

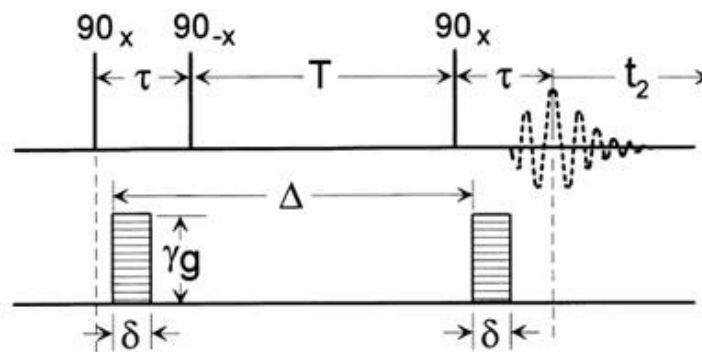


Figure 15 : Représentation schématique de la séquence d'écho stimulé ou PFG-STE (Extrait de Johnson⁹⁴).

La relaxation des spins s'effectue donc principalement entre la seconde et la troisième impulsion à 90° , c'est-à-dire de façon longitudinale. L'équation décrivant l'atténuation du signal reste néanmoins la même que celle donnée pour une PFG-SE (**Eq. 7**). Le principal avantage de la PFG-STE par rapport à la PFG-SE est d'offrir la possibilité à l'utilisateur

d'allonger le temps de diffusion (Δ) puisque les temps de relaxation transversale (T_2) sont dans la grande majorité des cas plus courts que les temps de relaxation longitudinale (T_1). La séquence d'écho stimulé permet également de s'affranchir de distorsions dans le spectre dues aux effets des couplages. Bien que cette séquence ne soit pas toujours à préférer puisque le rapport signal sur bruit de l'écho est moitié moins intense que celui obtenu avec une PFG-SE^{94,96}, elle est à la base de la plupart des autres séquences d'impulsions pour la mesure de la diffusion par RMN. Dans les séquences qui sont décrites ci-après, c'est donc le schéma de la PFG-STE qui sera utilisé comme base de départ.

2.4.2. Séquences classiques pour réduire les courants de Foucault

Un problème qui se pose régulièrement lors de la mesure d'un coefficient de diffusion par RMN provient de l'emploi des gradients de champ magnétique. En effet, ces derniers ont tendance à induire des courants de Foucault dans la bobine gradient. Ces courants dépendent de la force de l'impulsion de gradient et peuvent générer des distorsions dans les spectres RMN ou des changements anormaux de l'atténuation. Pour minimiser ces courants, deux méthodes sont principalement utilisées.

La première consiste à allonger le délai entre la dernière impulsion de gradient et l'écho du signal. Pour cela, une quatrième impulsion RF à 90° est réalisée au moment de l'écho afin de conserver l'aimantation dans la direction longitudinale pendant que les courants induits s'affaiblissent. Après un temps T_e , l'aimantation est replacée dans le plan transversal par l'intermédiaire d'une cinquième impulsion RF à 90° permettant l'acquisition du signal. Ainsi modifiée, la séquence d'écho stimulé prend le nom de séquence LED (Longitudinal Eddy current Delay)⁹⁷. La seconde méthode consiste à utiliser des paires de gradients bipolaires. L'idée est de remplacer chaque impulsion de gradient par deux gradients deux fois moins intenses, de différentes polarités et séparés par une impulsion RF à 180°. En procédant ainsi, le gradient effectif reste le même mais cette série d'impulsion permet de compenser les courants induits qui se forment après chaque impulsion de gradient^{94,98}. La combinaison de ces gradients bipolaires avec la séquence LED forme la séquence BBP-LED (Bipolar Pulse Pair - Longitudinal Eddy Current Delay) qui est présentée en **Figure 16**.

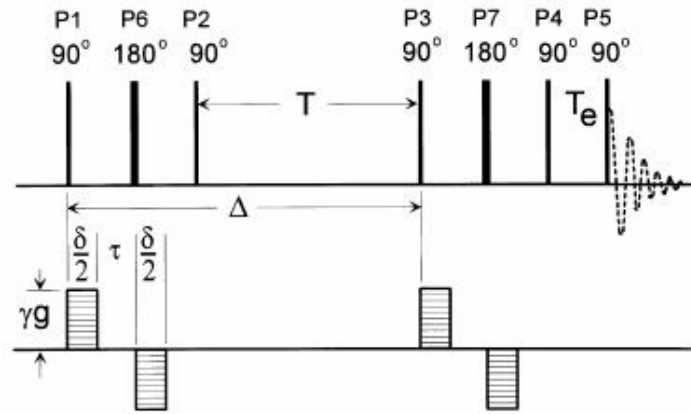


Figure 16 : Représentation schématique de la séquence BPP-LED (Extrait de Johnson⁹⁴).

Bien que de nombreuses autres séquences aient été développées en utilisant différents trains et/ou formes d'impulsions⁹⁹⁻¹⁰⁵, la BPP-LED permet de réduire de façon très efficace les courants induits et est très vite devenue l'une des séquences de diffusion les plus utilisées¹⁰⁶. Il est à noter que lorsque cette dernière séquence est employée, l'équation décrivant l'atténuation du signal (**Eq. 7**) est légèrement modifiée car le délai expérimental permettant de changer la polarité des gradients n'est pas nul. En cohérence avec le schéma présenté en **Figure 16**, celle-ci s'écrit alors :

$$E = \exp\left(-\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2}\right) D\right) \quad 10$$

2.4.3. Suppression du signal du solvant

Lorsque l'on s'intéresse aux signaux de solutés, un autre problème récurrent en RMN peut intervenir. Celui-ci provient du signal du solvant qui est souvent trop intense pour pouvoir mesurer proprement la diffusion de solutés. Ce problème se pose particulièrement dans les échantillons biologiques puisque la proportion d'eau y est généralement très importante. Pour contourner cette difficulté, l'eau deutériée (D₂O) est souvent utilisée de façon partielle ou totale. Néanmoins, cette solution n'est pas toujours réalisable et les molécules d'H₂O et de D₂O n'ayant pas exactement les mêmes propriétés physico-chimiques, l'extrapolation des résultats aux matrices réelles peut parfois être délicate. Aussi, diverses séquences de diffusion permettant de supprimer le signal du solvant ont-elles été proposées.

Certaines de ces techniques, telle qu'une présaturation préalable du solvant, sont simples et parfois suffisantes. D'autres séquences sont plus complexes mais permettent

d'obtenir une meilleure suppression^{104,107,108}. Parmi ces dernières, celles intégrant un schéma WATERGATE (WATER suppression by GrAdient-Tailored Excitation) ont démontré leur grande efficacité et présentent l'avantage de rester des séquences simples^{107,109}. Par exemple, le schéma WATERGATE peut s'insérer dans la séquence BPP à l'emplacement habituel du délai LED (Figure 17), ou encore à la place de l'impulsion RF à 180° dans la séquence d'écho de spin¹⁰⁷.

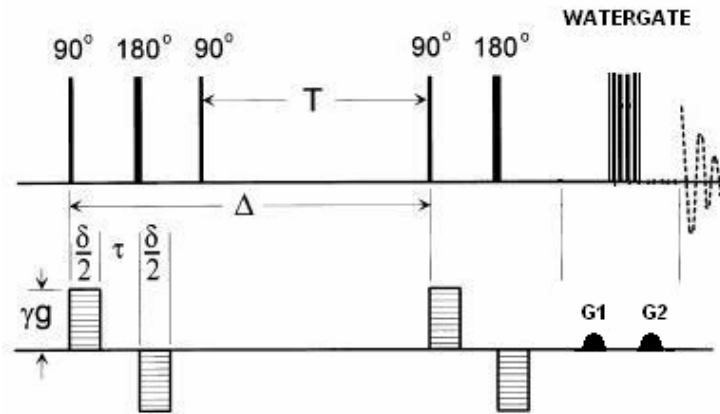


Figure 17 : Représentation schématique de la séquence STE-BPP avec un schéma WATERGATE intégré.

La technique du WATERGATE est une impulsion à 180°, ou un train d'impulsion permettant un 180° effectif, encadré par deux impulsions de gradient de champ magnétique¹¹⁰. La première impulsion G₁ défocalise toutes les cohérences. Le basculement à 180° inverse toutes les résonances, sauf celles situées sur la fréquence ciblée (e.g. celle de l'eau) et à des multiples de celle-ci (multiples qui sont paramétrables). Ainsi, la seconde impulsion de gradient de champ G₂ refocalise toutes les résonances hormis celles situées sur la fréquence ciblée (et aux multiples). Cette méthode est l'une des plus efficaces pour supprimer le signal du solvant puisque des facteurs de réduction de l'ordre de 10⁴ peuvent être facilement atteints¹⁰⁷. L'équation décrivant la décroissance du signal est la même que pour la BPP-LED (Eq. 10).

2.5. Atténuation non classique du signal RMN

Comme expliqué précédemment, l'atténuation du signal est classiquement décrite par $\ln(E) = -kD$, avec k dépendant de Δ (le temps de diffusion), δ (la durée de l'impulsion de gradient) et g (l'intensité de l'impulsion de gradient). Néanmoins, il arrive que la décroissance

du signal en fonction de k ne puisse plus être décrite par cette simple relation. Plusieurs causes pouvant être à l'origine de ce phénomène sont détaillées dans les paragraphes suivants.

2.5.1. Diffusion libre et diffusion restreinte

Dans les matrices qui présentent plusieurs phases (gels, émulsions...) la diffusion d'une molécule peut être soit libre soit restreinte. Dans le cas d'une diffusion libre, lorsque l'on mesure la diffusion d'une molécule en absence d'échange, l'intervalle de diffusion (Δ) que nous choisissons n'a aucun effet sur le résultat. Ceci suppose néanmoins que le temps de relaxation de l'espèce en question soit suffisamment long pour qu'un signal mesurable puisse être récupéré, et que les mesures ne soient pas affectées par certaines complications expérimentales comme des flux liés à des gradients thermiques. Par contre, si l'espèce étudiée se situe dans une géométrie restreinte, la distance qu'elle aura parcourue en diffusant lors d'une expérience sera fonction de Δ , de son coefficient de diffusion, de la taille et de la forme de l'espace de confinement. Par conséquent, si les effets de frontière ne sont pas pris en compte, un coefficient de diffusion apparent sera obtenu.

La **Figure 18** schématise ces effets. Dans un cas, la particule diffuse librement alors que dans l'autre cas, elle est confinée dans une sphère de rayon R . La paroi de la sphère est telle que la particule ne peut pas la traverser et rebondit. Il est alors possible de définir une variable sans dimension, ξ , avec laquelle la diffusion restreinte peut être caractérisée et qui s'écrit :

$$\xi = D\Delta / R^2 \quad 11$$

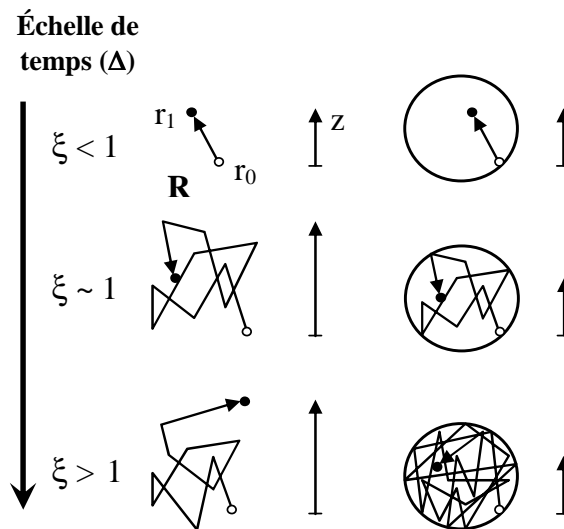


Figure 18 : Représentation schématique de la diffusion restreinte (Extrait de Price⁹⁰).

Pour des particules qui diffusent librement, le coefficient de diffusion déterminé est indépendant de Δ . Le déplacement mesuré dans la direction z reflète donc le coefficient de diffusion réel. Cependant, pour des particules confinées dans la sphère, la situation est entièrement différente :

- Pour des faibles valeurs de Δ ($\xi \ll 1$) les particules ne diffusent pas sur une distance assez grande pour que les effets de restriction soient visibles. Le coefficient de diffusion mesuré sera le coefficient d'auto-diffusion.
- A $\xi \approx 1$, quelques particules subissent les effets de restriction. Le coefficient de diffusion mesuré sera un coefficient de diffusion apparent et dépendra de Δ .
- Pour des grandes valeurs de Δ ($\xi > 1$), toutes les particules subissent les effets de restriction. Le coefficient de diffusion ne dépend alors plus de Δ mais de R .

Lorsque la diffusion est restreinte, l'atténuation du signal n'est donc plus exponentielle à partir d'une valeur de Δ qui est liée aux limites géométriques du système. L'atténuation du signal pouvant être directement représentée sur une échelle logarithmique, on parle souvent d'atténuation linéaire ou non linéaire. Si la valeur de Δ est augmentée au-delà de cette valeur, l'atténuation du signal reste alors constante car les molécules ne peuvent plus diffuser dans d'autres espaces que la cavité dans laquelle elles se trouvent (**Figure 19**).

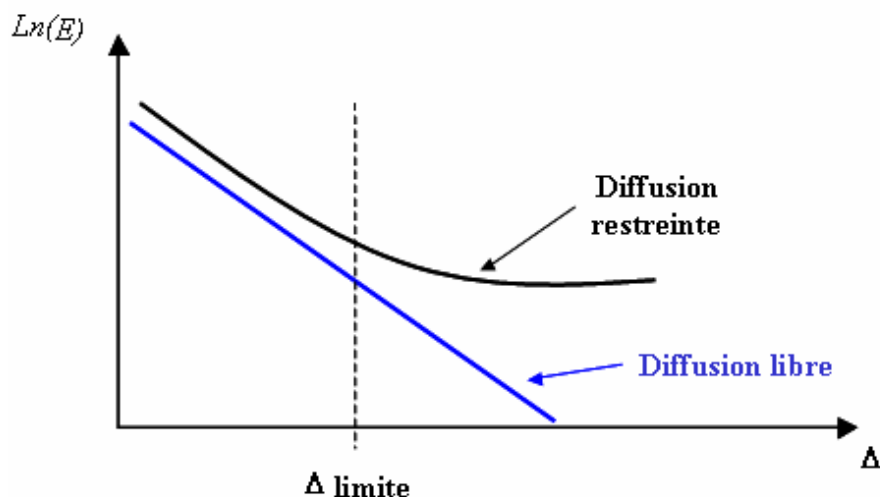


Figure 19. Représentation schématique de l'écho du signal RMN en fonction de Δ lorsque la diffusion est libre ou restreinte.

Bien entendu, la géométrie de tels échantillons n'est en générale pas parfaite. Des cavités plus ou moins fermées, de tailles et de formes différentes peuvent être rencontrées dans une même matrice. Cela peut compliquer sérieusement l'analyse des données en fonction du temps de diffusion Δ mais aussi lorsque Δ est gardé constant et que la série de spectres de signal décroissant est obtenue en incrémentant les valeurs de g (voire de δ). En effet, s'il existe des cavités fermées de tailles variables, bien qu'ayant un Δ constant, les molécules se situant dans les plus petites cavités peuvent subir des effets de restriction tandis que celles situées dans d'autres plus grandes n'ont pas le temps de rencontrer les parois. Il s'ensuit que pour une valeur donnée de Δ , l'atténuation du signal en fonction de k peut s'écarter du cas classique où l'on a : $\ln(E) = -kD$.

2.5.2. Coefficient de diffusion multiple

Plusieurs molécules différentes peuvent présenter des signaux RMN qui se superposent. Chaque molécule ayant son propre coefficient de diffusion, l'atténuation du signal est alors fonction d'autant d'exponentielles qu'il y a de molécules. Dans le cas général, s'il y a n composantes dans un même signal RMN, l'équation décrivant son atténuation devient :

$$E = \sum_{1 \text{ à } n} P_n \cdot \exp(-kD_n) \quad 12$$

avec P_n la proportion relative de chaque composante ayant un coefficient de diffusion D_n .

Dans le cas où seules deux molécules présentent un même signal RMN, l'**Eq. 12** s'écrit donc :

$$E = P_1 \cdot \exp(-kD_1) + P_2 \cdot \exp(-kD_2) \quad 13$$

Bien que la représentation de $\ln(E)$ en fonction de k ne soit plus linéaire, dans la majorité des cas, chacune des composantes peut être déterminée avec une bonne précision à l'aide de l'**Eq. 13**. En revanche, lorsqu'un signal RMN est constitué de plus de deux composantes, cette décomposition devient souvent trop difficile pour obtenir des résultats précis.

La **Figure 20** ci-dessous illustre l'atténuation bi-exponentielle d'un signal RMN contenant de l'eau et de la matière grasse¹¹¹. Les auteurs ont utilisé l'**Eq. 13** pour calculer les coefficients de diffusion de chacune des composantes du signal.

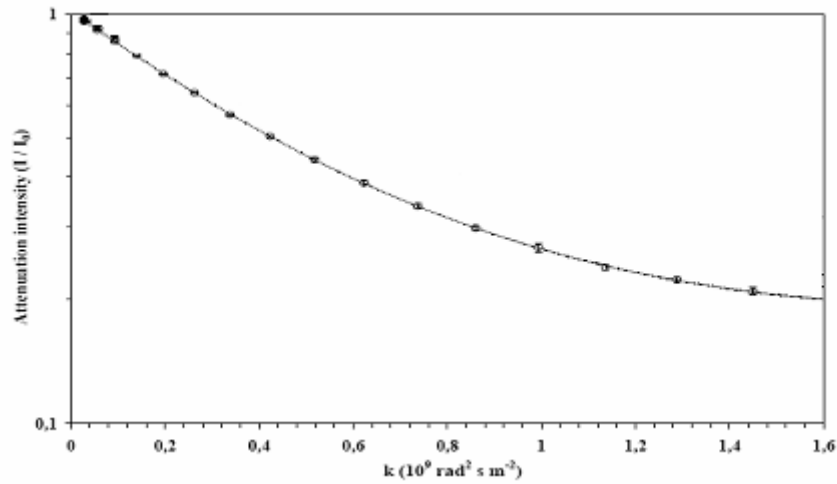


Figure 20. Atténuation du signal contenant de l'eau et de la matière grasse en fonction de k dans un système caséique à 40°C. Le trait est un ajustement de l'équation 11 avec $D_1 = D_{eau}$ et $D_2 = D_{mat. grasse}$ (Extrait de *Métais*¹¹¹).

De façon similaire à ce qui est observé lorsque plusieurs molécules différentes présentent une même raie en RMN, l'atténuation du signal d'une espèce polydispense est constituée d'une multitude de composantes. Les espèces polydispenses les plus couramment rencontrées sont des polymères. En pratique, il n'est en effet pas possible de synthétiser un ensemble de molécules polymériques ayant exactement les mêmes masses. On distingue donc deux masses pour les polymères : M_n , la masse moléculaire moyenne en nombre et M_w , la masse moléculaire moyenne en poids. Le rapport de ces deux valeurs caractérise la dispersion des masses autour de la valeur moyenne : c'est l'indice de polydispersité M_w/M_n . Si cet indice est égal à 1, alors $M_w = M_n$ et le polymère est dit monodisperse. Sinon, le rapport M_w/M_n sera d'autant supérieur à 1 que la dispersion en masse du polymère (et donc en coefficients de diffusion) sera grande.

Ainsi, plus l'indice de polydispersité d'un polymère sera grand, plus l'atténuation du signal RMN s'écartera de la linéarité (**Figure 21**).

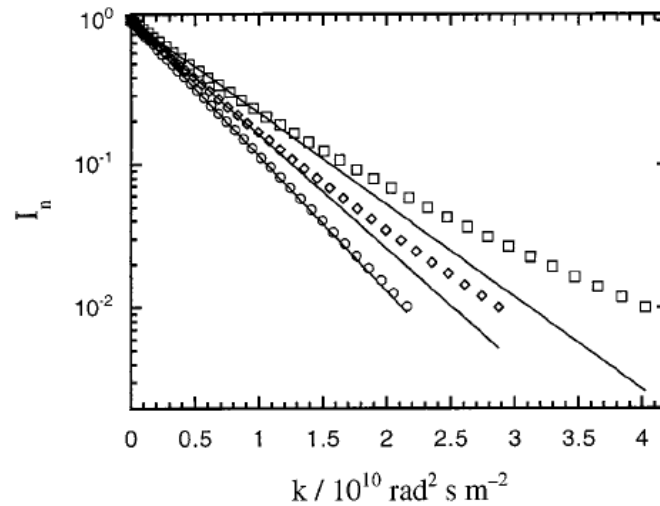


Figure 21. Atténuation du signal RMN d'un polymère de 10^6 g/mol, assumant une polydispersité de forme log-normal, avec $M_w/M_n = 1,05, 1,4$ et 2 de gauche à droite (Extrait de Hakansson et al.¹¹²).

L'équation décrivant l'atténuation du signal est donc la même que celle donnée pour n composantes (Eq. 12) sauf que dans ce cas précis, il est possible de connaître le nombre de spins équivalent porté par chaque molécule de masse différente. En supposant qu'il n'y ait pas d'interactions entre les polymères de différentes masses, le signal de l'écho est alors donné par l'équation :

$$\ln(E) = -k \left(\frac{\sum \rho_i M_i D_i}{\sum \rho_i M_i} \right) = -k \langle D \rangle \quad 14$$

avec ρ_i le nombre de molécules de masse M_i ayant un coefficient de diffusion D_i , et $\langle D \rangle$, le coefficient de diffusion moyen en masse.

En pratique, Callaghan et Pinder¹¹³ ont montré que l'atténuation du signal d'une espèce polydisperse pouvait être correctement décrite par la formule suivante :

$$\ln(E) = -k \langle D \rangle + \frac{1}{2} k^2 \langle D \rangle^2 \left[1 - (M_w / M_n)^{-4/5} \right] \quad 15$$

Il est ainsi possible d'obtenir un coefficient de diffusion moyen.

2.5.3. Autres causes possibles

D'autres causes peuvent être à l'origine d'une atténuation non classique du signal RMN. Tout d'abord, et sans pour autant invoquer une diffusion restreinte, la structure de la matrice peut parfois expliquer ce phénomène. En effet, la diffusion d'une molécule est généralement supposée être isotrope, c'est-à-dire uniforme dans toutes les directions de

l'espace. Cependant, dans certains échantillons, des chemins plus propices que d'autres à la diffusion peuvent être présents et être globalement alignés dans une direction privilégiée^{114,115}. De même, si un échantillon possède une structure hétérogène à une échelle supérieure à la distance sondée pendant l'expérience, une molécule diffusant librement rencontrera plus ou moins d'obstacles selon sa position dans l'échantillon¹¹⁶. Comme pour la dispersion en masse d'un polymère, on parle alors parfois de polydispersité de la matrice. Lorsque le système dans lequel diffuse la molécule étudiée est anisotrope ou présente des hétérogénéités à grande échelle, l'atténuation du signal s'écarte donc de la linéarité^{114,115,117-119}.

Il existe également des cas où l'apparition d'une courbure dans la représentation $\ln(E) = -kD$ n'a pas de cause clairement identifiée¹¹⁷⁻¹²³. Ces phénomènes mal compris sont généralement observés pour des grosses molécules flexibles et sont d'autant plus importants que la concentration de l'échantillon augmente. Les raisons pouvant être invoquées pour expliquer de tels résultats sont nombreuses mais spéculatives. Parmi les hypothèses avancées que l'on rencontre dans la littérature¹¹⁷⁻¹²³, on peut par exemple citer des effets d'échelles exaltant la dispersion des coefficients de diffusion de molécules polydisperses, des interactions moléculaires spécifiques, ou encore l'adoption d'une conformation allongée du polymère rendant ainsi les mesures de diffusion transrationnelle sensibles à des contributions rotationnelles de la molécule... Selon les échantillons, ces hypothèses sont plus ou moins pertinentes mais en règle générale les auteurs ne donnent aucune conclusion stricte à cause du manque de données et de connaissances concernant l'apparition de ces phénomènes.

2.6. Conclusions

La RMN à gradient de champ pulsé est une méthode standard pour mesurer un coefficient de diffusion de façon rapide et précise. Elle peut être utilisée dans un très grand nombre d'échantillons et possède l'avantage d'être non-invasive. La diffusion du solvant ou celle de solutés peut être étudiée sans traitement préalable de l'échantillon. De plus, plusieurs coefficients de diffusion peuvent parfois être mesurés en une seule mesure. C'est le cas lorsque le signal mesuré provient de plusieurs molécules qui ont des coefficients de diffusion distincts, ou lorsque les coefficients de diffusion de molécules ayant des signaux RMN différents sont suffisamment proches. Enfin, dans le cas d'espèces polydisperses (e.g. des

polymères), un coefficient de diffusion moyen peut être déterminé lorsque l'espèce d'intérêt est polydisperse.

Notons également que des interactions moléculaires ou des phénomènes d'association peuvent éventuellement être mis en évidence^{120,124}. Des informations sur la structure de certains échantillons peuvent également être révélées lorsque la diffusion est restreinte en faisant varier Δ . Il est par exemple possible de déterminer la distribution en taille ainsi que la taille moyenne des gouttes dans des émulsions^{100,125-127}. Néanmoins, même dans le cas où la diffusion des molécules est libre et que l'échantillon est globalement homogène, des effets de structure peuvent être mis en évidence. Pour cela, plutôt que d'étudier la diffusion du solvant, il est préférable d'étudier la diffusion de molécules plus grandes et relativement inertes vis-à-vis de la matrice. La méthode la plus commune consiste à utiliser des polymères de masses moléculaires variables comme sondes, et dans cette optique, les polymères de polyéthylène glycol sont les plus souvent employés.

3. La diffusion de molécules-sonde, les polyéthylèneglycols

3.1. Le polyéthylèneglycol

Le polyéthylèneglycol (PEG) de formule brute $\text{OH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ est un polymère synthétique, soluble dans l'eau, non toxique et qui est largement utilisé dans les industries chimiques et biomédicales. Les PEGs standards sont synthétisés à partir de monomères d'éthylène glycol alors que les oxydes de polyéthylène (PEO), qui sont des molécules très proches, sont issus de la polymérisation d'éther éthylique. La seule différence de fonctionnalité notable entre ces deux types de polymère provient de leurs groupes terminaux. En effet, un PEG possède des groupes hydroxyles en bout de chaînes alors que le PEO n'en présente qu'un seul puisque l'autre extrémité est constituée par le fragment initiateur de la réaction de polymérisation (en général le t-butyl). Les PEGs standards peuvent atteindre un poids moléculaire d'environ $20 \cdot 10^3$ g/mol. Au-delà, il est en effet difficile de créer des polymères monodisperses à partir d'éthylène glycol. Par contre, les polymères monodisperses à grand poids moléculaire sont synthétisables lorsque l'éther éthylique est utilisé comme matériel de départ. Les PEOs sont donc privilégiés pour des masses moléculaires importantes. Néanmoins, puisque ces deux types de polymère se différencient principalement par leur mode de synthèse alors qu'ils ne diffèrent chimiquement que par une seule extrémité, le terme PEG sera indifféremment utilisé dans la suite de ce rapport pour parler des PEGs et des PEOs.

Le choix du PEG en tant que sonde résulte des nombreux avantages que présente l'emploi de ce polymère. Tout d'abord, les PEGs sont solubles dans l'eau et présentent une seule raie fine en RMN autour de 3,6 ppm. De plus, les PEGs sont disponibles dans le commerce dans une large gamme de poids moléculaires allant d'environ 200 à 10^6 g/mol avec des indices de polydispersité n'excédant pas 1,1. Enfin, ces polymères sont connus pour interagir très faiblement avec les protéines¹²⁸⁻¹³² ce qui permet d'observer directement des effets d'obstructions dans des matrices protéiques.

Dans la suite de cette étude bibliographique, seuls les résultats concernant la diffusion des PEGs seront présentés pour illustrer les principaux effets qui influencent leur diffusion. Nous détaillerons également les premiers travaux qui ont été réalisés sur la diffusion de ces sondes dans des produits laitiers.

3.2. Effet des matrices sur la diffusion des PEGs

Comme illustré en **Figure 22** pour des PEGs de différentes tailles dans de l'alcool polyvinylique (PVA) plus ou moins concentré¹³³, les résultats de toutes les études montrent une forte dépendance de la diffusion du PEG en fonction de la concentration de la matrice. Indépendamment du système et de la taille de la sonde, la diffusion des PEGs diminue quand la concentration de la matrice augmente^{122,123,133-143}.

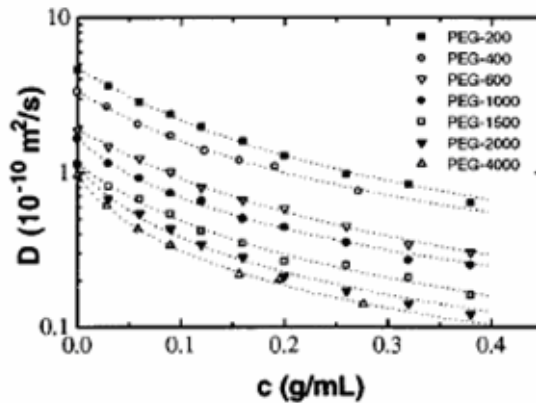


Figure 22. Coefficients de diffusion de PEGs de différentes tailles en fonction de la concentration en PVA à 23°C (Extrait de Masaro et al.¹³³).

Au-delà de la concentration des matrices, la diffusion des PEGs est également sensible à des effets de composition-structure des matrices. Par exemple, Brown et Stilbs¹³⁵ ont montré que la diffusion d'un PEG de 73000 g/mol dans des solutions de dextran ayant une même concentration massique diminue avec l'augmentation du poids moléculaire des molécules de dextran (20000, 110000 et 50000 g/mol) (**Figure 23**).

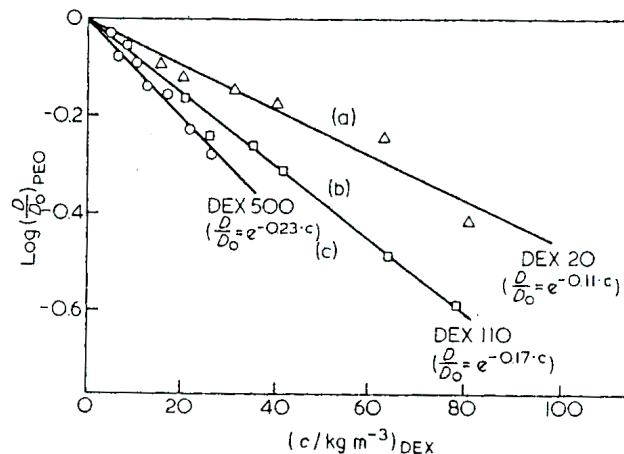


Figure 23. Log du coefficient de diffusion normalisé du PEG 73000 g/mol en fonction de la concentration en dextran ayant des masses moléculaires de : a) 20000 b) 110000 et c) 500000 g/mol (Extrait de Brown and Stilbs¹³⁵).

Comme l'ont démontré les auteurs, ce phénomène s'explique entièrement par les différences d'interactions frictionnelles imposées par la matrice.

Notons qu'au-delà des interactions frictionnelles, des interactions physico-chimiques spécifiques peuvent aussi exister entre des sondes moléculaires et les constituants des matrices. Néanmoins, les PEGs étant des molécules relativement inertes, notamment vis-à-vis des protéines, leur diffusion est généralement expliquée par des effets de structure des matrices. Pour illustrer ces effets, nous ne détaillerons que les résultats spécifiques aux matrices biologiques, tels que des systèmes à base de polysaccharides et de protéines. Nous présenterons ensuite les travaux précédemment réalisés sur la diffusion de PEGs dans des matrices caséiques.

3.2.1. Matrices à base de polysaccharides

Notons tout d'abord que pour comparer l'amplitude des changements de diffusion pour des PEGs de différentes tailles, les coefficients de diffusion sont normalisés. Pour cela, on utilise le rapport D/D_0 , où D est le coefficient de diffusion mesuré dans un échantillon et D_0 celui mesuré dans le solvant. Ce rapport permet ainsi de comparer l'amplitude des obstructions subies par des diffusants différents.

De nombreuses études ont montré une dépendance de la diffusion à la taille du PEG dans des solutions et des gels^{123,133,135,136,139,141,142,144}, dans des cartilages¹⁴⁵ ou encore dans du coton humide¹⁴⁶. Il ressort de tous ces travaux que la réduction de la diffusion des PEGs est d'autant plus importante que le poids moléculaire (et donc la taille) des PEGs est élevée. Un exemple extrait des travaux de Kwak et Lafleur¹⁴¹, qui ont étudié la diffusion de PEGs dans des gels de polysaccharides (de curdlan), est présenté en **Figure 24**.

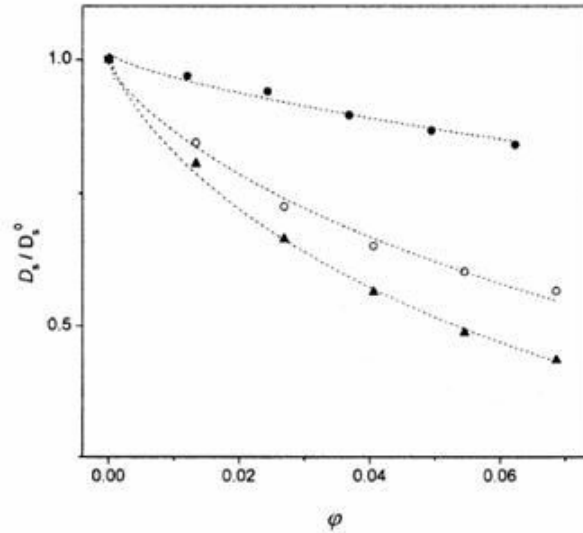


Figure 24. Coefficients de diffusion normalisés de l'eau (\bullet), du PEG 1000 g/mol (\circ), du PEG 3350 g/mol (\blacktriangle) en fonction de la fraction volumique (ϕ) des polysaccharides, à 45°C (Extrait de Kwak and Lafleur¹⁴¹).

Pour une fraction volumique maximale en polysaccharides de 0,07, le coefficient de diffusion normalisé du PEG 1000 g/mol est environ égal à 0,56 alors qu'il est d'environ 0,43 pour le PEG 3350 g/mol. Les auteurs associent ce phénomène au rapport entre la taille du soluté et la taille des pores du gel. Plus les sondes sont volumineuses, plus elles rencontrent d'obstacles et plus elles subissent des effets d'obstruction.

D'autres résultats plus récents permettent d'illustrer plus encore l'influence de la structure d'une matrice sur la diffusion des sondes moléculaires. Par exemple, Walther *et al.*¹⁴⁷, ont clairement mis en évidence l'impact que de la structure de solutions et de gels de κ -carraghénanes sur la diffusion de PEGs. Pour cela, ils ont gélifié des solutions de κ -carraghénanes contenant plus ou moins de sels à 90°C puis ont, soit doucement, soit très rapidement, refroidi le gel formé. Ces auteurs ont caractérisé les microstructures des gels par microscopie électronique et ont en parallèle mesuré la diffusion d'un PEG de 634 g/mol dans ces matrices. Les résultats qu'ils ont obtenus sont présentés en **Figure 25**.

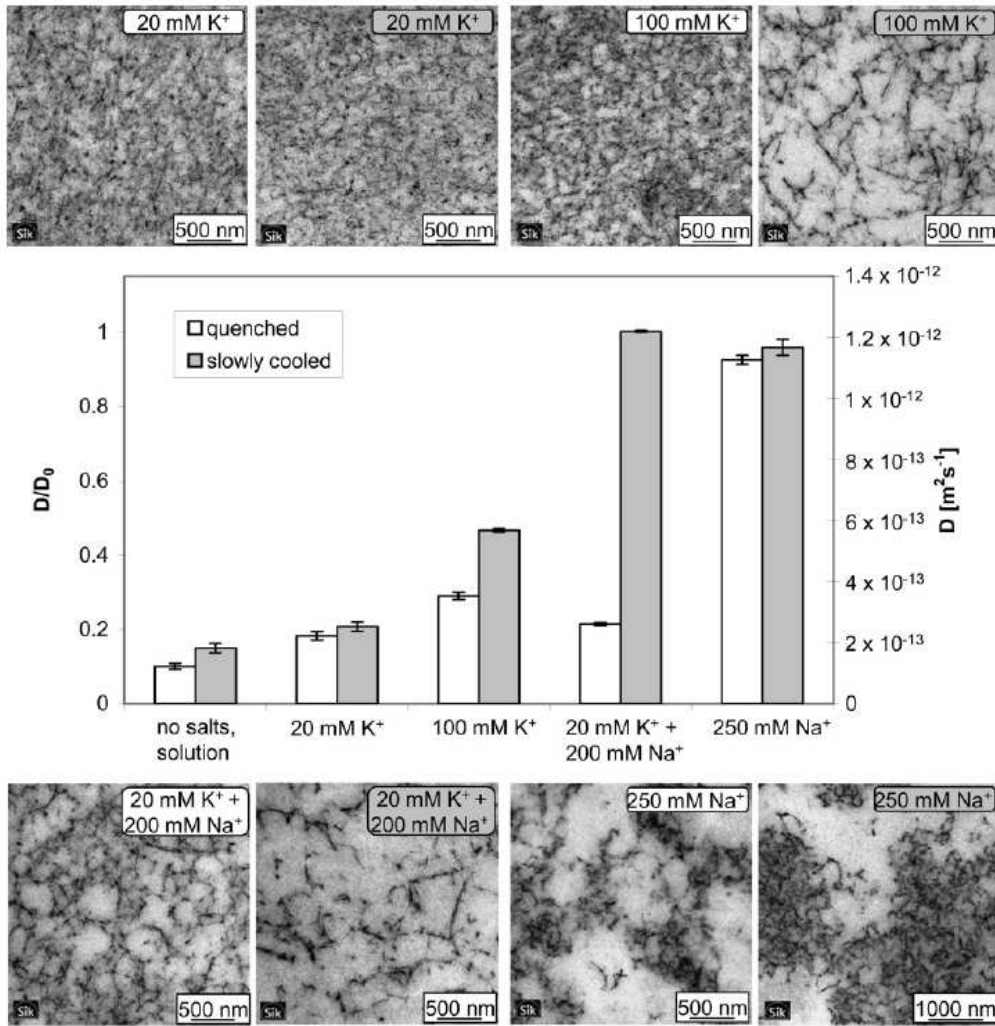


Figure 25. D et D/D_0 d'un PEG de 634 g/mol pour différentes structures d'un système de κ -carraghénanes (1% en masse). En blanc : refroidi très rapidement ; En gris : refroidi lentement (Extrait de Walther et al.¹⁴⁷).

Tout d'abord il faut remarquer que le coefficient de diffusion du PEG est étonnamment faible en solution ($D/D_0 \sim 0,1$) malgré une concentration faible en κ -carraghénanes (1 %). En guise de comparaison, pour un PEG de 1000 g/mol et pour une concentration de 6 % massique dans D_2O , son rapport D/D_0 est d'environ 0,60 dans une solution de PVA¹³⁹ et de 0,65 dans un gel de curdlan (un autre polysaccharides)¹⁴¹ (**Figure 24**). Ainsi, suivant l'organisation des obstacles en solution, la réduction de la diffusion est différente. Par ailleurs, pour une même solution initiale, selon le gel formé, il apparaît clairement que la diffusion du PEG est d'autant plus rapide que les agrégats constitutifs du réseau sont espacés. Les variations du coefficient de diffusion du PEG selon la structure de la matrice sont mêmes très importantes puisque le rapport D/D_0 passe d'environ 0,1 dans la solution à environ 0,9 dans les gels contenant 250 mM d'ions sodium. Selon les auteurs, c'est

la quantité d'espaces « vides » dans lesquels le PEG peut facilement diffuser qui explique ces grandes différences de coefficients de diffusion.

Les résultats obtenus par Baldursdottir *et al.*¹²² vont dans le même sens. Dans cette étude, les auteurs ont comparé la diffusion de différents PEGs dans des solutions et gels d'alginate ayant subi ou non une dégradation chimique photo-induite (**Figure 26-a**).

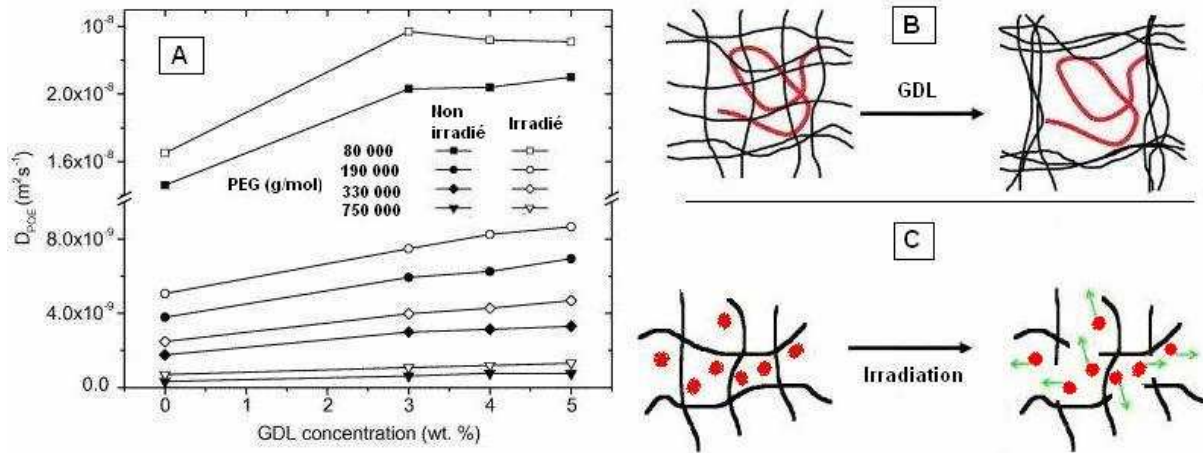


Figure 26. A) Coefficients de diffusion de PEGs de différents poids moléculaire dans des solutions et gels d'alginate (2 % en masse) irradiés ou non ; différents gels sont obtenus en ajoutant différentes quantités de GDL. B) Représentation schématique de l'effet de la GDL. C) Représentation schématique de l'effet de l'irradiation (Extrait de Baldursdottir *et al.*¹²²).

Il ressort de ces résultats que la diffusion des PEGs était augmentée :

- Après la gélification du système (lorsque la concentration en GDL devient positive)
- Après modifications de la structure du gel (en variant la quantité de GDL ajouté ou par dégradation chimique photo-induite)
- D'autant plus que les PEGs étaient petits.

Comme illustré en **Figure 26-b** et **Figure 26-c**, d'après Baldursdottir *et al.*¹²², ces augmentations de la diffusion sont toutes causées par l'établissement d'une structure plus « ouverte ».

3.2.2. Matrices protéiques

Les mêmes conclusions ressortent des études réalisées dans des matrices protéiques. Par exemple, Colsenet *et al.*¹⁴⁸ ont montré que la diffusion de PEGs est augmentée après

gélification des protéines solubles du lait, et ont expliqué ces résultats par la « création d’espaces vides » sur la base d’images de microscopie électronique. Ces auteurs utilisent ce même type d’arguments pour expliquer pourquoi la diffusion des PEGs est environ deux fois plus faible dans ces matrices que dans des systèmes à base de micelles de caséines^{149,150}. Ils expliquent en effet que les protéines solubles du lait se répartissent de façon homogène dans de l’eau, tandis que dans les suspensions de micelles de caséines, la très grande majorité des protéines se concentrent dans la structure colloïdale. Ils en concluent que c’est la différence d’espaces « vides » entre les protéines (ou agrégats de protéines), qui explique les écarts de coefficients de diffusion.

Ces résultats sont aussi très similaires à ceux de Laffite *et al.*¹⁵¹ qui ont montré, dans des gels de mucine gastrique, que des PEGs de différents poids moléculaires diffusaient tous plus lentement quand le pH était augmenté de 1 à 4 (**Figure 27**). Encore une fois, les auteurs ont relié leurs résultats à l’organisation spatiale que prennent les protéines dans ces matrices. Selon eux, les coefficients de diffusion reflètent le niveau d’agrégation des protéines puisque, de pH 1 à 4, les protéines se déplissent et se répartissent de façon homogène dans tout le volume (**Figure 27**).

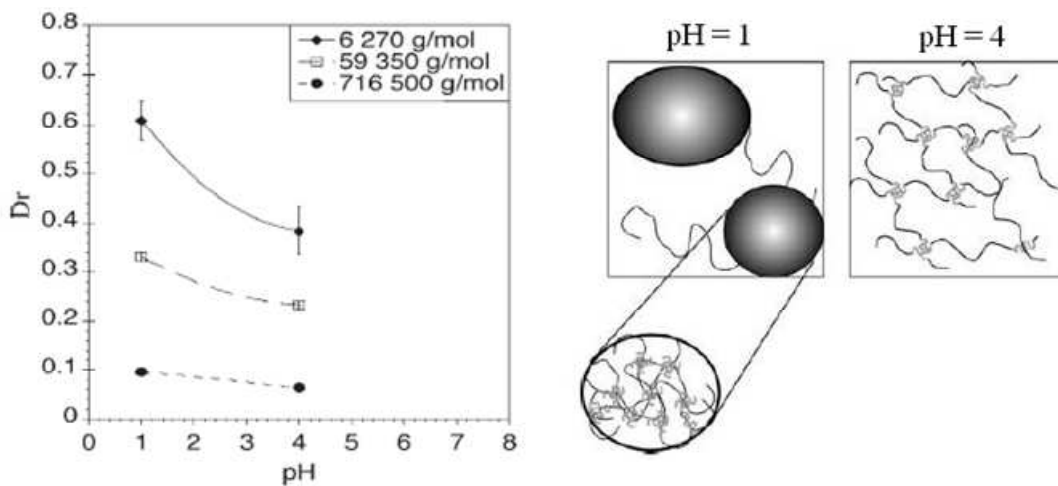


Figure 27. $D_r = D/D_0$ de différents PEGs à différents pH dans un système de mucine gastrique du porc (5% en masse) (Extrait de Laffite *et al.*¹⁵¹).

Comme illustré en **Figure 26** et **Figure 27**, une autre conclusion commune à toutes ces études est que la diffusion d’une sonde sera, selon sa taille, plus ou moins sensible aux changements de structure des matrices. Le rapport de taille entre la sonde moléculaire et

l'échelle des modifications structurales semble donc être un paramètre important à prendre en considération.

3.2.3. Matrices caséiques

Une seule étude a été réalisée sur la diffusion de PEGs dans des solutions et gels de micelles de caséines. Celle-ci a été réalisée par Colsenet *et al.*¹⁵⁰ pour différentes concentrations et des PEGs ayant des masses moléculaires allant de 1080 à 634000 g/mol. Les résultats obtenus dans les suspensions de micelles de caséines sont présentés en **Figure 28** et montrent, comme précédemment illustré pour d'autres matrices, que la diffusion des PEGs diminue avec la concentration en caséines et avec la taille du diffusant.

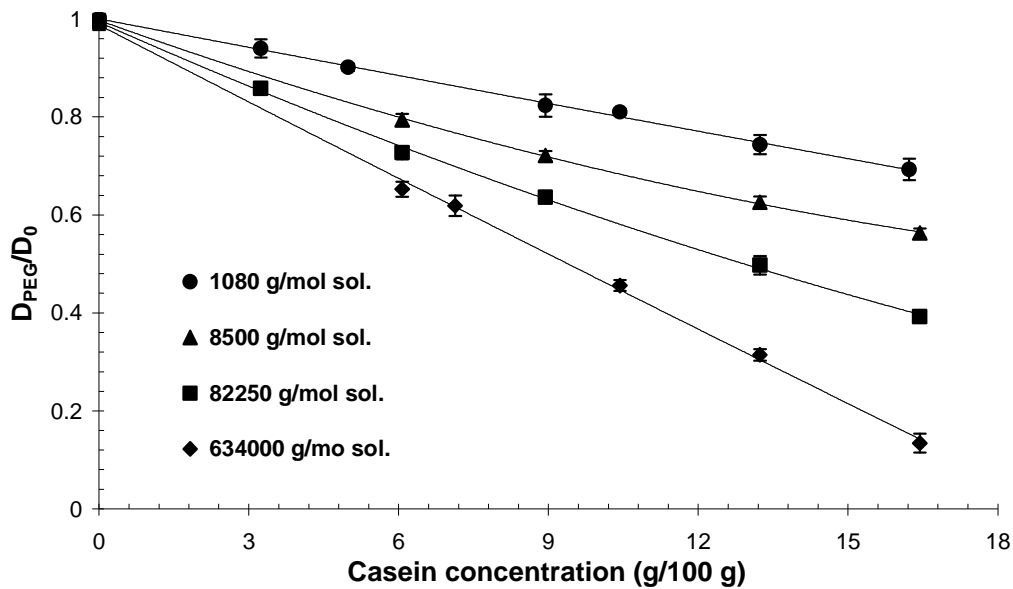


Figure 28. Coefficients de diffusion normalisés de PEGs de différents poids moléculaires dans des suspensions de micelles de caséines en fonction de la concentration (Extrait de Colsenet *et al.*¹⁵⁰).

Dans ce même article¹⁵⁰, les auteurs ont ensuite étudié l'influence de la coagulation présure sur les coefficients de diffusion de chacune de ces sondes. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 29** sous forme des rapports des coefficients de diffusion obtenus avant et après gélification.

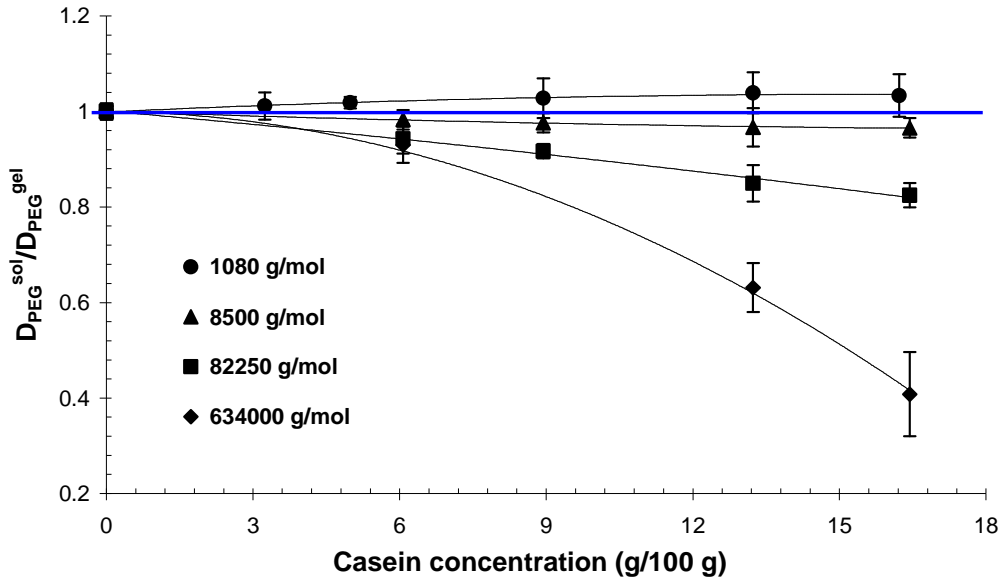


Figure 29. Coefficients de diffusion de PEGs de différents poids moléculaires dans des suspensions de micelles de caséines divisés par ceux obtenus après gélification présure (Extrait de Colsenet et al.¹⁵⁰).

Ces résultats montrent que la diffusion des deux PEGs de grande taille est fortement augmentée après gélification, et ceci, d'autant plus que la concentration en caséines est élevée. En revanche, aucun changement significatif n'a été observé pour les deux sondes plus petites.

Tous ces résultats sont donc en très bon accord avec les connaissances actuelles sur la diffusion des PEGs puisque les principaux effets rapportés dans la littérature sont observés, i.e. les effets de concentration, de la taille du diffusant et de la structure de la matrice. Notons également que l'atténuation des échos du signal RMN du PEG de 634000 g/mol présentait une légère courbure qui a été attribuée par les auteurs à la dispersion en masse de ce polymère, bien que l'indice de polydispersité donnée par le fournisseur était faible ($M_w/M_n = 1.07$).

Comme Mariette *et al.*¹⁵² l'avaient fait pour décrire la diffusion de l'eau dans les matrices caséiques, les auteurs ont modélisé l'ensemble de ces résultats à l'aide du « cell model »¹⁵³. Ceci leur a permis de tirer certaines conclusions quant au mode de diffusion des PEGs dans les systèmes caséiques. Sans entrer dans les détails de ce modèle, il repose sur le principe que les micelles peuvent être assimilées à des sphères et que celles-ci ne sont pas

imperméables aux PEGs. En effet, de façon similaire à ce qu'il avait été montré pour l'eau, les coefficients de diffusion des PEGs auraient dû être plus importants s'ils diffusaient dans un système de sphères dures. De façon cohérente avec la forte porosité et perméabilité des micelles de caséines (voir paragraphe 1.4), les auteurs ont ainsi montré que la diffusion des PEGs pouvait très bien s'expliquer en supposant que les molécules-sonde peuvent diffuser au travers des particules caséiques à l'état liquide comme à l'état gélifié. Cependant, ce modèle n'a pas permis de modéliser correctement la diffusion du PEG de 634000 g/mol. Ce dernier résultat peut s'expliquer de deux manières : soit par les limites du modèle, soit par le fait qu'une telle molécule ne peut pas diffuser au travers des particules.

De plus, bien que ce modèle ait permis d'expliquer les coefficients des autres PEGs, il ne permet pas d'expliquer la forte augmentation de la diffusion des deux sondes de grande taille. Néanmoins, comme nous l'avons vu dans le paragraphe **1.5.1**, la fraction volumique occupée par les agrégats caséiques diminue lorsque les réarrangements structuraux prennent place suite à la coagulation présure. Les augmentations de la diffusion des PEGs 82250 et 634000 g/mol semblent donc pouvoir s'expliquer par l'augmentation des espaces « vides ».

3.3. Analyse des données de diffusion

De nombreuses études ont été menées pour décrire théoriquement la diffusion de solvants ou de solutés dans les solutions, les gels et même les solides. Ces différents modèles sont basés sur différents concepts physiques :

- **La théorie du volume libre.** Dans cette théorie, la diffusion se produit quand le soluté « saute » dans des vides formés par la redistribution des molécules de solvant. Les espaces vides entourant les molécules de solvant sont appelés les « volumes libres ». La vitesse de diffusion est déterminée par la longueur du saut qui est à peu près équivalente au diamètre du soluté, par la vélocité thermique du soluté et par la probabilité de présence d'un volume libre proche de la molécule de soluté¹⁴¹.

- **Les effets d'obstruction.** Les chaînes de la matrice sont considérées comme des obstacles impénétrables. Le passage d'un soluté ne peut donc se faire que par les ouvertures entre ces chaînes. Lorsque les molécules diffusantes rencontrent les chaînes de la matrice, elles sont forcées de les contourner. La distance à parcourir pour aller d'un point à un autre augmente donc en présence d'obstacles.

- **Les interactions hydrodynamiques.** Elles prennent en compte les interactions hydrodynamiques présentes dans l'ensemble du système. Ces interactions incluent les interactions de friction entre le soluté et la matrice, entre le soluté et le solvant et entre le solvant et la matrice. De telles considérations permettent la description de la diffusion dans des régimes plus concentrés, notamment quand les constituants de la matrice commencent à s'enchevêtrer, ce qui semblait difficile avec les modèles d'obstruction.

Masaro¹⁵⁴ a rédigé une revue très détaillée décrivant les principaux modèles de diffusion selon la théorie à laquelle ils appartiennent. Certains de ces modèles ont réussi à décrire la diffusion de PEGs mais chaque modèle présente de nombreuses limites, en particulier pour les molécules de taille élevée et pour les milieux concentrés. Les modèles les plus simples négligent des paramètres importants comme la taille du soluté. Ainsi, ils sont incapables de décrire les différences entre les coefficients de diffusion de molécules-sonde différentes, e.g. le modèle de Mackie et Meares^{155,156}. D'autres plus complexes sont ajustés avec des paramètres variables (souvent des propriétés physiques du milieu) qui ne sont pas connus ou qui sont difficiles à évaluer. Ces paramètres étant différents pour un système soluté/polymère donné, il est la plupart du temps impossible de pouvoir prédire leurs valeurs. De plus, les significations réelles de certains paramètres d'ajustement sont très floues, e.g. dans le modèle d'Amsden¹⁵⁷, celui de Petit *et al.*¹⁴² ou celui de Phillis^{142,158,159}.

Une étude très récente réalisée par Babu *et al.*¹⁶⁰ semble néanmoins corroborer l'hypothèse selon laquelle la diffusion des PEGs augmenterait lorsqu'il se créerait plus d'espaces « vides » dans l'échantillon. Ces auteurs ont montré à l'aide de simulations que la diffusion de sphères de différentes tailles évoluant dans des milieux constitués de sphères dures (soit placées au hasard dans tout l'espace, soit jointes les unes aux autres de diverses manières) était principalement affectée par l'espace qui leur était accessible. Ainsi, bien que ces simulations utilisent des obstacles et des diffusants de forme idéalisée, elles confirment l'interprétation qualitative donnée par divers auteurs. Il faut effectivement préciser que les PEGs les plus couramment utilisés sont des chaînes linéaires, c'est-à-dire des molécules déformables. Bien que des rayons de giration ou hydrodynamique puissent être déterminés, on ne peut pas toujours présumer de la conformation adoptée par ces polymères, notamment lorsque des longues chaînes flexibles diffusent dans des milieux concentrés. Elles peuvent, en

fonction des contraintes liées leur environnement immédiat, prendre des formes plus ou moins allongées comme cela a été décrit par le modèle de reptation de De Gennes^{161,162}.

Le manque de modèle permettant de décrire des effets de structure et la flexibilité des PEGs permettent de comprendre pourquoi la plupart des auteurs, comme ceux cités dans le paragraphe 3.2, se contentent d'expliquer qualitativement leurs résultats. En ce sens, le concept du volume accessible à la diffusion semble très intéressant pour interpréter de façon simple de telles données.

3.4. Conclusions

Tous les résultats montrent que la diffusion des PEGs est non seulement sensible à la composition des matrices mais aussi à leur microstructure. Les phénomènes de gélification et d'autres modifications structurales peuvent ainsi être mis en évidence en mesurant les coefficients de diffusion de molécules-sonde sans que leur diffusion ne soit pour autant restreinte. De plus, selon son poids moléculaire, un PEG sera plus ou moins affecté par ces réorganisations de la microstructure des échantillons. Il semble cependant difficile de prévoir à l'avance la taille que doit avoir la molécule-sonde pour mettre le plus significativement en évidence un changement structural donné.

En ce qui concerne la diffusion moléculaire dans les solutions et les gels de caséines, il apparaît qu'en dessous d'une certaine masse, les PEGs soient capables de diffuser au travers des particules et agrégats caséiques. La diffusion des PEGs de faible masse moléculaire semble pouvoir s'expliquer simplement par des effets de concentration. En revanche, la diffusion de PEGs ayant une masse moléculaire importante est plus rapide après la coagulation d'une solution par la présure, et ce, d'autant plus que les échantillons sont concentrés. La compaction des agrégats caséiques semble en être la cause mais il existe un manque de données expérimentales pour mieux comprendre la relation qui relie les coefficients de diffusion des molécules-sonde à la structure des échantillons.

4. Description du projet

Plusieurs travaux concernant la diffusion de l'eau dans diverses matrices laitières ont été réalisés par Callaghan *et al.*¹⁶³, Godefroy et Callaghan¹⁶⁴, Mariette *et al.*¹⁵², Métais¹¹¹, Colsenet¹⁶⁵ et Gottwald *et al.*¹⁶⁶. Tous ces travaux ont conclu à l'effet dominant de l'extrait sec sur la diffusion de l'eau. En ce qui concerne les systèmes caséiques, toutes les études réalisées jusqu'à présent ont même montré que les coagulations par la présure ou par acidification n'ont pas d'influence significative sur la diffusion de l'eau^{111,152}. La diffusion de l'eau dans les solutions et gels de caséines semble donc complètement déterminée par la teneur en protéines.

C'est ce constat qui a conduit Colsenet *et al.*¹⁵⁰ à étudier la diffusion de PEGs dans des matrices caséiques afin de déterminer si elle pouvait être sensible à des effets de structure. Ces auteurs ayant montré que ceci était le cas lorsque les PEGs étaient suffisamment volumineux, l'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre l'influence qu'à la structure des matrices caséiques sur la diffusion de ces molécules-sonde. Ces travaux ont donc pour but principal d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Peut-on mieux appréhender la relation qui existe dans le couple échelle de structure et taille de la sonde ?
- Si les PEGs peuvent diffuser au travers des particules caséiques, leur diffusion est-elle influencée par la structure interne de celles-ci ?
- Le facteur le plus influent est-il la taille des particules, l'établissement d'un réseau macroscopique, la structure du réseau... ?

Pour répondre à ces interrogations, il était nécessaire de mieux connaître la sensibilité de la diffusion des molécules-sonde à la structure des échantillons. Dans un premier temps, de nouvelles expériences ont donc été réalisées dans des gels caséiques ayant des microstructures bien différenciables pour étoffer l'approche initiée par Colsenet *et al.*¹⁵⁰. Pour cela, la diffusion de PEGs de tailles variables a été mesurée dans des gels présure, acide et mixte structurellement caractérisés par microscopie électronique. Toutes ces données sont présentées et discutées sous forme d'un article dans le *chapitre III*.

Dans les expériences suivantes, une nouvelle approche a été utilisée. Elle consiste à suivre l'évolution des coefficients de diffusion de PEGs au cours des différents types de coagulation. De plus, afin de pouvoir s'appuyer sur les données de la littérature décrivant les mécanismes de coagulation, une séquence intégrant une suppression du signal du solvant a été employée pour passer de l'étude de systèmes à base de D₂O à celle de systèmes classiques, c'est-à-dire à base d'H₂O. L'ensemble des résultats obtenus avec cette méthode sont présentés sous la forme de deux articles :

Le premier d'entre eux constitue le *chapitre IV* et traite de la diffusion d'un petit et d'un gros PEG au cours de la coagulation d'une suspension de micelles de caséines par la chymosine. Les résultats sont comparés à l'évolution des propriétés rhéologiques de l'échantillon et à celle de la microstructure du gel dans les heures suivant l'établissement du réseau.

La même approche a été utilisée dans le second article, qui est présenté dans le *chapitre V*, pour caractériser l'influence des étapes des coagulations acide et mixte sur la diffusion des mêmes PEGs. Les résultats obtenus dans cette étude permettent de tirer des conclusions générales sur les principaux paramètres influençant la diffusion des PEGs dans les matrices caséiques, et illustrent le potentiel de ce type d'étude pour révéler l'occurrence de changements structuraux.

Enfin, le *chapitre VI* présente une discussion générale de ces résultats, les principales conclusions et les perspectives qui découlent de ces travaux.

5. Références

1. Cheftel, J.C., J.L. Cuq, and D. Lorient, *Protéines Alimentaires*. **1985**, Paris: Lavoisier.
2. Cayot, P. and D. Lorient, *Structures et technofonctions des protéines du lait*, ed. Tech&Doc. **1998**, Paris: Lavoisier.
3. Dalgleish, D.G., *Structure-function relationships of caseins*, in *Food proteins and their applications*, S. Damodaran and A. Paraf, Editors. **1997**, Marcel Dekker, Inc.: New York, USA. p. 199-223.
4. Horne, D.S., *Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products*. *International Dairy Journal*, **1998**. 8(3): p. 171-177.
5. Kumosinski, T.F., H. Pessen, H.M. Farrell, Jr., and H. Brumberger, *Determination of the quaternary structural states of bovine casein by small-angle X-Ray scattering: Submicellar and micellar forms*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1988**. 266: p. 548-561.
6. McMahon, D.J. and R.J. Brown, *Composition, Structure, and Integrity of casein micelles: a review*. *Journal of Dairy Science*, **1984**. 67: p. 499-512.
7. Desobry-Banon, S. *Modification de la structure des micelles de caseine lors de l'acidification du lait par hydrolyse de Glucono-Delta-Lactone*. Thesis, I.N.P.L., **1991**.
8. Gagnaire, V., A. Pierre, D. Molle, and J. Leonil, *Phosphopeptides interacting with colloidal calcium phosphate isolated by tryptic hydrolysis of bovine casein micelles*. *Journal of Dairy Research*, **1996**. 63(3): p. 405-422.
9. Walstra, P., *On the stability of casein micelles*. *Journal of Dairy Science*, **1990**. 73: p. 1968-1979.
10. Rollema, H.S., *Casein association and micelle formation*, in *Advanced Dairy Chemistry Proteins*, P.F. Fox, Editor. **1992**, Elsevier Applied Science: London. p. 111-140.
11. Schmidt, D.G., *Colloidal aspects of casein*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **1980**. 34: p. 42-64.

12. McGann, T.C.A., W.J. Donnelly, R.D. Kearney, and W. Buchheimm, *Composition and size distribution of bovine casein micelles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, **1980**. 630(2): p. 261-270.
13. Walstra, P. and R. Jenness, *Casein micelles*, in *Dairy Chemistry and Physics*. **1984**, John Wiley and Sons: New-York. p. 229-253.
14. Sandra, S., M. Alexander, and D.G. Dalgleish, *The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy*. Journal of Colloid and Interface Science, **2007**. 308(2): p. 364-373.
15. Alexander, M. and D.G. Dalgleish, *Application of transmission diffusing wave spectroscopy to the study of gelation of milk by acidification and rennet*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, **2004**. 38(1-2): p. 83-90.
16. Holt, C. and D.S. Horne, *The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1996**. 50(2): p. 85-111.
17. Walstra, P., *The voluminosity of bovine casein micelles and some of its applications*. Journal of Dairy Science, **1979**. 46: p. 317-323.
18. Bringe, N.A., and J. E. Kinsella, *Forces involved in the enzymatic and the acidic coagulation of casein micelles*, in *Developments in Food Protein*, B.J.F. Hudson, Editor. **1987**, Elsevier Applied Science: London. p. 159-194.
19. Holt, C., *Structure and stability of bovine casein micelles*. Advances in Protein Chemistry, **1992**. 43: p. 63-151.
20. Horne, D.S., *Casein micelles as hard spheres: Limitations of the model in acidified gel formation*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2003**. 213: p. 255-263.
21. Morr, C.V., *Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles*. Journal of Dairy Science, **1967**. 50: p. 1744-1751.
22. Ono, T. and T. Obata, *A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits*. Journal of Dairy Research, **1989**. 56: p. 453-461.
23. Walstra, P., *Casein sub-micelles: Do they exist?* International Dairy Journal, **1999**. 9: p. 189-192.

24. Horne, D.S., *Casein micelle structure: Models and muddles*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2006**. 11: p. 148-153.
25. Holt, C., D.T. Davies, and A.J.R. Law, *Effects of colloidal calcium phosphate content and free calcium ion concentration in the milk serum on the dissociation of bovine casein micelles*. Journal of Dairy Research, **1986**. 53: p. 557-572.
26. Panouille, M., L. Benyahia, D. Durand, and T. Nicolai, *Dynamic mechanical properties of suspensions of micellar casein particles*. Journal of Colloid and Interface Science, **2005**. 287(2): p. 468-475.
27. McMahon, D.J. and W.R. McManus, *Rethinking casein micelle structure using electron microscopy*. Journal of Dairy Science, **1998**. 81(11): p. 2985-2993.
28. Garnier, J. and B. Ribadeau-Dumas, *Structure of the casein micelle. A proposed model*. Journal of Dairy Research, **1970**. 37: p. 493-504.
29. Farrell, H.M., E.L. Malin, E.M. Brown, and P.X. Qi, *Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?* Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2006**. 11(2-3): p. 135-147.
30. Marchin, S., J.L. Putaux, F. Pignon, and J. Leonil, *Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering*. Journal of Chemical Physics, **2007**. 126 (4): p. Art. No. 045101.
31. Lucey, J.A., *Formation and physical properties of milk protein gels*. Journal of Dairy Science, **2002**. 85(2): p. 281-294.
32. Horne, D.S., *Casein structure, self-assembly and gelation*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2002**. 7(5-6): p. 456-461.
33. Dalgleish, D.G., P. Spagnuolo, and D.H. Goff, *A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy*. International Dairy Journal, **2004**. 14: p. 1025-1031.
34. Banon, S. and J. Hardy, *L'eau dans les produits laitiers*, ed. Tec&Doc. **2002**, Paris: Lavoisier.
35. Tanford, C., *Protein denaturation*. Advances in Protein Chemistry, **1968**. 23: p. 121-282.

36. Famelart, M.H., F. Lepasant, F. Gaucheron, Y. Legraet, and P. Schuck, *pH-induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: Influence of aqueous phase*. Lait, **1996**. 76(5): p. 445-460.
37. Gastaldi, E., A. Lagaude, S. Marchesseau, and B.T. De la Fuente, *Acid milk gel formation as affected by total solids content*. Journal of Food Science, **1997**. 62(4): p. 671-675.
38. Fox, P.F. and P.L.H. McSweeney, *Dairy chemistry and biochemistry*. **1998**, London: Chapman and Hall.
39. Boulet, M., M. Britten, and F. Lamarche, *Voluminosity of some food proteins in aqueous dispersions at various pH and ionic strengths*. Food Hydrocolloids, **1998**. 12(4): p. 433-441.
40. Stothart, P.H. and D.J. Cebula, *Small-angle neutron scattering study of bovine casein micelles and sub-micelles*. Journal of Molecular Biology, **1982**. 160: p. 391-395.
41. Dalgleish, D.G. and J.R. Law, *pH-induced dissociation of bovine casein micelles. 2. Mineral solubilization and its relation to casein release*. Journal of Dairy Research, **1989**. 56: p. 727-735.
42. Creamer, K., G.P. Berry, and O.E. Mills, *A study of the dissociation of beta-casein of the bovin casein micelle at low temperature*. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, **1997**. 12: p. 58.
43. De Kruif, C.G., R. Tuinier, C. Holt, P.A. Timmins, and H.S. Rollema, *Physicochemical study of kappa- and beta-casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase*. Langmuir, **2002**. 18(12): p. 4885-4891.
44. O'Connell, J.E. and C.G. De Kruif, *Beta-casein micelles; cross-linking with transglutaminase*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2003**. 216: p. 75-81.
45. Schorsch, C., H. Carrie, A.H. Clark, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 519-528.

46. Schorsch, C., H. Carrie, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 529-539.
47. Fox, P.F., and D. M. Mulvihill, *Casein*, in *Food Gels*, P. Harris, Editor. **1990**, Elsevier Applied Science: London. p. 121–171.
48. Walstra, P., V.A. Bloomfield, G.J. Wei, and R. Jenness, *Effect of chymosin action on the hydrodynamic diameter of casein micelles*. Biochimica et Biophysica Acta, **1981**. 669: p. 258-259.
49. Mellema, M., J.W.M. Heesakkers, J.H.J. Van Opheusden, and T. Van Vliet, *Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry*. Langmuir, **2000**. 16(17): p. 6847-6854.
50. Mellema, M., P. Walstra, J.H.J. Van Opheusden, and T. Van Vliet, *Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels*. Advances in Colloid and Interface Science, **2002**. 98(1): p. 25-50.
51. Lucey, J.A., T. van Vliet, K. Grolle, T. Geurts, and P. Walstra, *Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- $[\delta]$ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties*. International Dairy Journal, **1997**. 7: p. 389-397.
52. Bauer, R., M. Hansen, S. Hansen, L. Ogendal, S. Lomholt, K. Qvist, and D. Horne, *The structure of casein aggregates during renneting studied by indirect fourier transformation and inverse laplace transformation of static and dynamic light-scattering data, respectively*. Journal of Chemical Physics, **1995**. 103(7): p. 2725-2737.
53. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono-delta-lactone*. Journal of Dairy Research, **2000**. 67(3): p. 415-427.
54. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid*. International Dairy Journal, **2001**. 11: p. 559-565.

55. Karlsson, A.O., R. Ipsen, and Y. Ardo, *Rheological properties and microstructure during rennet induced coagulation of UF concentrated skim milk*. International Dairy Journal, **2007**. 17(6): p. 674-682.
56. Lagoueyte, N., J. Lablee, A. Lagaude, and B.T. De la Fuente, *Temperature affects microstructure of renneted milk gel*. Journal of Food Science, **1994**. 59(5): p. 956-959.
57. Vetier, N., S. Banon, V. Chardot, and J. Hardy, *Effect of temperature and aggregation rate on the fractal dimension of renneted casein aggregates*. Journal of Dairy Science, **2003**. 86(8): p. 2504-2507.
58. Zoon, P., T. Van Vliet, and P. Walstra, *Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 4. The effect of pH and NaCl*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1989**. 43: p. 17-34.
59. Green, M.L., *Effect of manipulation of milk composition and curd-forming conditions on the formation, structure and properties of milk curd*. Journal of Dairy Research, **1987**. 54: p. 303-313.
60. Vetier, N., S. Banon, J.P. Ramet, and J. Hardy, *Casein micelle solvation and fractal structure of milk aggregates and gels*. Lait, **2000**. 80(2): p. 237-246.
61. Banon, S. and J. Hardy, *A colloidal approach of milk acidification by glucono-delta-lactone*. Journal of Dairy Science, **1992**. 75(4): p. 935-941.
62. Banon, S. and J. Hardy, *Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection*. Journal of Dairy Research, **1991**. 58: p. 75-84.
63. Alexander, M., M. Corredig, and D.G. Dalgleish, *Diffusing wave spectroscopy of gelling food systems: The importance of the photon transport mean free path (l^*) parameter*. Food Hydrocolloids, **2006**. 20(2-3): p. 325-331.
64. Dalgleish, D., M. Alexander, and M. Corredig, *Studies of the acid gelation of milk using ultrasonic spectroscopy and diffusing wave spectroscopy*. Food Hydrocolloids, **2004**. 18(5): p. 747-755.
65. Gastaldi, E., A. Lagaude, and B.T. De la Fuente, *Micellar transition state in casein between pH 5.5 and 5.0*. Journal of Food Science, **1996**. 61(1): p. 59-65.

66. Lee, W.J. and J.A. Lucey, *Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature*. Journal of Dairy Science, **2004**. 87(10): p. 3153-3164.
67. Uricanu, V.I., M.H.G. Duits, and J. Mellema, *Hierarchical networks of casein proteins: An elasticity study based on atomic force microscopy*. Langmuir, **2004**. 20(12): p. 5079-5090.
68. Roefs, S.P.F.M., P. Walstra, D.G. Dalgleish, and D.S. Horne, *Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1985**. 39: p. 119-122.
69. Famelart, M.H., J. Tomazewski, M. Plot, and S. Pezennec, *Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein systems*. International Dairy Journal, **2004**. 14(4): p. 313-321.
70. Lucey, J.A. and H. Singh, *Formation and physical properties of acid milk gels: a review*. Food Research International, **1998**. 30: p. 529-542.
71. De Kruif, C.G., *Skim milk acidification*. Journal of Colloid and Interface Science, **1997**. 185(1): p. 19-25.
72. Mariette, F. and P. Marchal, *NMR relaxation studies of dairy processes*. Journal of Magnetic Resonance Analysis, **1996**. 2(4): p. 290-296.
73. Vetier, N., S. Desobry-Banon, M.M.O. Eleya, and J. Hardy, *Effect of temperature and acidification rate on the fractal dimension of acidified casein aggregates*. Journal of Dairy Science, **1997**. 80(12): p. 3161-3166.
74. Ozer, B.H., R. Stenning, A.S. Grandison, and R.K. Robinson, *Effect of protein concentration on the properties and structure of concentrated yogurts*. International Journal of Dairy Technology, **1999**. 52(4): p. 135-138.
75. Auty, M.A.E., B.T. O'Kennedy, P. Allan-Wojtas, and D.M. Mulvihill, *The application of microscopy and rheology to study the effect of milk salt concentration on the structure of acidified micellar casein systems*. Food Hydrocolloids, **2005**. 19(1): p. 101-109.

76. Schkoda, P., A. Hechler, and H.G. Kessler, *Effect of minerals and pH on rheological properties and syneresis of milk-based acid gels*. International Dairy Journal, **1999**. 9: p. 269-273.
77. Karlsson, A.O., R. Ipsen, K. Schrader, and Y. Ardo, *Relationship between physical properties of casein micelles and rheology of skim milk concentrate*. Journal of Dairy Science, **2005**. 88(11): p. 3784-3797.
78. Tranchant, C.C., D.G. Dalgleish, and A.R. Hill, *Different coagulation behaviour of bacteriologically acidified and renneted milk: the importance of fine-tuning acid production and rennet action*. International Dairy Journal, **2001**. 11: p. 483-494.
79. Noel, Y., N. Lehembre, A. Dulac, and M.C. Clavaud, *Comparaison des cinétiques de coagulation enzymatique et mixte du lait. Influence du calcium*. Lait, **1989**. 69: p. 479-490.
80. Noel, Y., C. Durier, N. Lehembre, and A. Kobilinsky, *Etude multifactorielle de la coagulation mixte du lait analysée par viscoélasticimétrie*. Lait, **1991**. 71: p. 15-39.
81. Roefs, S.P.F.M., T. Van Vliet, H.J.C.M. Van Den Bijgaart, A.E.A. De Groot-Mostert, and P. Walstra, *Structure of casein gels made by combined acidification and rennet action*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1990**. 44: p. 159-188.
82. Van Vliet, T., C.M.M. Lakemond, and R.W. Visschers, *Rheology and structure of milk protein gels*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2004**. 9(5): p. 298-304.
83. Aichinger, P.A., M. Michel, C. Servais, M.L. Dillmann, M. Rouvet, N. D'Amico, R. Zink, H. Klostermeyer, and D.S. Horne, *Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, **2003**. 31: p. 243-255.
84. Castillo, M., J.A. Lucey, T. Wang, and F.A. Payne, *Effect of temperature and inoculum concentration on gel microstructure, permeability and syneresis kinetics. Cottage cheese-type gels*. International Dairy Journal, **2006**. 16(2): p. 153-163.
85. Lopez, M.B., S.B. Lomholt, and K.B. Qvist, *Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effect of pH and enzyme concentration*. International Dairy Journal, **1998**. 8(4): p. 289-293.

86. Mariette, F., P. Maignan, and P. Marchal, *NMR relaxometry: A sensor for monitoring acidification of milk*. *Analisis*, **1997**. 25(1): p. M24-M27.
87. Hwang, S.N., C.L. Chin, F.W. Wehrli, and D.B. Hackney, *An image-based finite difference model for simulating restricted diffusion*. *Magnetic Resonance in Medicine*, **2003**. 50(2): p. 373-382.
88. Hagslatt, H., B. Jonsson, M. Nyden, and O. Soderman, *Predictions of pulsed field gradient NMR echo-decays for molecules diffusing in various restrictive geometries. Simulations of diffusion propagators based on a finite element method*. *Journal of Magnetic Resonance*, **2003**. 161(2): p. 138-147.
89. Topgaard, D., *Probing biological tissue microstructure with magnetic resonance diffusion techniques*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2006**. 11(1): p. 7-12.
90. Price, W.S., *Pulsed field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part 1. Basic theory*. *Concepts in Magnetic Resonance*, **1997**. 9: p. 299-336.
91. Hahn, E.L., *Spin echoes*. *Physical Review*, **1950**. 80(4): p. 580-594.
92. Carr, H.Y. and E.M. Purcell, *Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments*. *Physical Review*, **1954**. 94(3): p. 630-638.
93. Stejskal, E.O. and J.E. Tanner, *Spin diffusion measurements : spin echoes in the presence of time-dependent field gradient*. *The Journal of Chemical Physics*, **1965**. 42: p. 288-292.
94. Johnson, C.S., *Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: Principles and applications*. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **1999**. 34: p. 203-256.
95. Colsenet, R. *Etude par RMN de la diffusion moléculaire : influence de la structure des protéines laitières à l'état liquide et gélifié*. Thesis, Nantes, **2005**.
96. Tanner, J.E., *Use of stimulated echo in NMR diffusion studies*. *Journal of Chemical Physics*, **1970**. 52(5): p. 2523-2526.

97. Gibbs, S.J. and C.S. Johnson, *A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents*. Journal of Magnetic Resonance, **1991**. 93: p. 395-402.
98. Topgaard, D. *Nuclear magnetic resonance studies of water self-diffusion in porous systems*. Thesis, Lund, **2003**.
99. Price, W.S., *Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion : Part II. Experimental aspects*. Concepts in Magnetic Resonance, **1998**. 10: p. 197-237.
100. Topgaard, D., C. Malmberg, and O. Soderman, *Restricted self-diffusion of water in a highly concentrated W/O emulsion studied using modulated gradient spin-echo NMR*. Journal of Magnetic Resonance, **2002**. 156(2): p. 195-201.
101. Van Den Enden, J.C., D. Waddington, H. Van Aalst, C.G. Van Kralingen, and K.J. Packer, *Rapid determination of water droplet size distributions by PFG-NMR*. Journal of Colloid and Interface Science, **1990**. 140: p. 105-113.
102. Van Dusschoten, D.V., P.A. De Jager, and H. Van As, *Flexible PFG NMR desensitized for susceptibility artifacts, using the PFG multiple-spin-echo sequence*. Journal of Magnetic Resonance Series A, **1994**. 112: p. 237-240.
103. Momot, K.I. and P.W. Kuchel, *Convection-compensating PGSE experiment incorporating excitation-sculpting water suppression (CONVEX)*. Journal of Magnetic Resonance, **2004**. 169(1): p. 92-101.
104. Momot, K.I. and P.W. Kuchel, *PFG NMR diffusion experiments for complex systems*. Concepts in Magnetic Resonance Part A, **2006**. 28A(4): p. 249-269.
105. Cotts, R.M., M. J. R. Hoch, T. Sun, J. T. Markert, *Pulsed field gradients stimulated echo methods for improved NMR diffusion measurements in heterogeneous systems*. Journal of Magnetic Resonance, **1988**. 83: p. 252-266.
106. Wu, D.H., A.D. Chen, and C.S. Johnson, *An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses*. Journal of Magnetic Resonance Series A, **1995**. 115(2): p. 260-264.

107. Price, W.S., F. Elwinger, C. Vigouroux, and P. Stilbs, *PGSE-WATERGATE, a new tool for NMR diffusion-based studies of ligand-macromolecule binding*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2002**. 40(6): p. 391-395.
108. Dalvit, C., S.Y. Ko, and J.M. Bohlen, *Single and multiple-selective excitation combined with pulsed field gradients*. *Journal of Magnetic Resonance Series B*, **1996**. 110(2): p. 124-131.
109. Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenar, *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR-spectroscopy of aqueous solutions*. *Journal of Biomolecular NMR*, **1992**. 2(6): p. 661-665.
110. Sklenar, V., M. Piotto, R. Leppik, and V. Saudek, *Gradient-tailored water suppression for H-1-N-15 HSQC experiments optimized to retain full sensitivity*. *Journal of Magnetic Resonance Series A*, **1993**. 102(2): p. 241-245.
111. Métais, A. *Caractérisation des coefficients d'auto-diffusion de l'eau par RMN dans les gels laitiers en relation avec leur composition et leur structure*. Thesis, ENSAR, **2003**.
112. Hakansson, B., M. Nyden, and O. Söderman, *The influence of polymer molecular-weight distributions on pulsed field gradient nuclear magnetic resonance self-diffusion experiments*. *Colloid and Polymer Science*, **2000**. 278(5): p. 399-405.
113. Callaghan, P.T. and D.N. Pinder, *A pulsed field gradient NMR study of self-diffusion in a polydisperse polymer system - dextran in water*. *Macromolecules*, **1983**. 16(6): p. 968-973.
114. Topgaard, D. and O. Söderman, *Diffusion of water absorbed in cellulose fibers studied with H1-NMR*. *Langmuir*, **2001**. 17: p. 2694-2702.
115. Topgaard, D. and O. Soderman, *Self-diffusion on two and three-dimensional powders of anisotropic domain: an NMR study of the diffusion of water in cellulose and starch*. *The Journal of Physical Chemistry*, **2002**. 106(46): p. 11887-11892.
116. Duval, F., M. Cambert, and F. Mariette, *NMR study of tomato pericarp tissue by spin-spin relaxation and water self-diffusion*. *Applied Magnetic Resonance*, **2005**. 28: p. 29-40.

117. Nyden, M. and O. Soderman, *An NMR self-diffusion investigation of aggregation phenomena in solutions of ethyl(hydroxyethyl)cellulose*. *Macromolecules*, **1998**. 31(15): p. 4990-5002.
118. Nyden, M., O. Soderman, and G. Karlstrom, *A PFG NMR self-diffusion investigation of probe diffusion in an ethyl(hydroxyethyl)cellulose matrix*. *Macromolecules*, **1999**. 32(1): p. 127-135.
119. Rosen, O., M. Bostrom, M. Nyden, and L. Piculell, *Anomalous surfactant diffusion in a gel of chemically cross-linked ethyl(hydroxyethyl) cellulose*. *Journal of Physical Chemistry B*, **2003**. 107(17): p. 4074-4079.
120. Abrahmsen-Alami, S. and P. Stilbs, *H-1 NMR self-diffusion and multifield H-2 spin relaxation study of model associative polymer and sodium dodecyl-sulfate aggregation in aqueous solution*. *Journal of Physical Chemistry*, **1994**. 98(25): p. 6359-6367.
121. Nyström, B., H. Walderhaug, and F.K. Hansen, *Dynamic crossover effects observed in solutions of a hydrophobically associating water-soluble polymer*. *Journal of Physical Chemistry*, **1993**. 97(29): p. 7743-7752.
122. Baldursdottir, S.G., A.-L. Kjoniksen, and B. Nystrom, *The effect of riboflavin-photoinduced degradation of alginate matrices on the diffusion of poly(oxyethylene) probes in the polymer network*. *European Polymer Journal*, **2006**. 42(11): p. 3050-3058.
123. Walderhaug, H. and B. Nystrom, *A pulsed field gradient NMR study of poly(oxyethylene) diffusion in aqueous solutions and gels of ethyl(hydroxyethyl) cellulose-sodium dodecyl sulphate systems*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, **1999**. 149: p. 379-387.
124. Nilsson, S., K. Thuresson, B. Lindman, and B. Nystrom, *Associations in mixtures of hydrophobically modified polymer and surfactant in dilute and semidilute aqueous solutions. A rheology and PFG NMR self-diffusion investigation*. *Macromolecules*, **2000**. 33(26): p. 9641-9649.
125. Li, X.Y., J.C. Cox, and R.W. Flumerfelt, *Determination of emulsion size distribution by NMR restricted diffusion measurement*. *Aiche Journal*, **1992**. 38(10): p. 1671-1674.

126. Balinov, B., O. Soderman, and T. Warnheim, *Determination of water droplet size in margarines and low-calorie spreads by nuclear magnetic resonance self-diffusion*. Journal of the American Oil Chemists Society, **1994**. 71(5): p. 513-518.
127. Packer, K.J. and C. Rees, *Pulsed NMR studies of restricted diffusion - I. Droplet size distributions in emulsions*. Journal of Colloid and Interface Science, **1972**. 40(2): p. 206-218.
128. Atha, D.H. and K.C. Ingham, *Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols*. Journal of Biological Chemistry, **1981**(23): p. 12108-12117.
129. Bhat, R. and S.N. Timasheff, *Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols*. Protein Science, **1992**. 1(9): p. 1133-1143.
130. Hancock, T.J. and J.T. Hsu, *Thermal stability studies of a globular protein in aqueous poly(ethylene glycol) by H-1 NMR*. Biotechnology and Bioengineering, **1996**. 51(4): p. 410-421.
131. Hermans, J., *Excluded-volume theory of polymer-protein interactions based on polymer chain statistics*. Journal of Chemical Physics, **1982**. 77: p. 2193-2203.
132. Knoll, D. and J. Hermans, *Polymer-protein interactions*. Journal of Biological Chemistry, **1983**. 258: p. 5710-5715.
133. Masaro, L., X.X. Zhu, and P.M. Macdonald, *Self-diffusion of oligo- and poly(ethylene glycol)s in poly(vinyl alcohol) aqueous solutions as studied by pulsed-gradient NMR spectroscopy*. Macromolecules, **1998**. 31(12): p. 3880-3885.
134. Wills, P.R., Y. Georgalis, J. Dijk, and D.J. Winzor, *Measurement of thermodynamic nonideality arising from volume-exclusion interactions between proteins and polymers*. Biophysical Chemistry, **1995**. 57(1): p. 37-46.
135. Brown, W. and P. Stilbs, *Self-diffusion of poly(ethylene oxide) in aqueous dextran solutions measured using FT-pulsed field gradient NMR*. Polymer, **1982**. 24: p. 188-192.
136. Favre, E., M. Leonard, A. Laurent, and E. Dellacherie, *Diffusion of polyethyleneglycols in calcium alginate hydrogels*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2001**. 194: p. 197-206.

137. Masaro, L., M. Ousalem, W.E. Baille, D. Lessard, and X.X. Zhu, *Self-diffusion studies of water and poly(ethylene glycol) in solutions and gels of selected hydrophilic polymers*. *Macromolecules*, **1999**. 32(13): p. 4375-4382.
138. Masaro, L. and X.X. Zhu, *Interaction of ethylene glycol with poly(vinyl alcohol) in aqueous systems as studied by NMR spectroscopy*. *Langmuir*, **1999**. 15(24): p. 8356-8360.
139. Masaro, L., X.X. Zhu, and P.M. MacDonald, *Study of the self-diffusion of poly(ethylene glycol)s in poly(vinyl alcohol) aqueous systems*. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, **1999**. 37(17): p. 2396-2403.
140. Jo, B.W., M. Hess, and M. Zahres, *Self-diffusion of poly (ethylene oxide) - modified paclitaxel in dilute aqueous solutions*. *Materials Research Innovations*, **2003**. 7(3): p. 178-182.
141. Kwak, S. and M. Lafleur, *Self-diffusion of macromolecules and macroassemblies in curdlan gels as examined by PFG-SE NMR technique*. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, **2003**. 221(1-3): p. 231-242.
142. Petit, J.M., X.X. Zhu, and P.M. Macdonald, *Solute probe diffusion in aqueous solutions of poly(vinyl alcohol) as studied by pulsed-gradient spin-echo NMR spectroscopy*. *Macromolecules*, **1996**. 29(1): p. 70-76.
143. Vartapetian, R.S., E.V. Khozina, J. Karger, D. Geschke, F. Rittig, M.M. Feldstein, and A.E. Chalykh, *Self-diffusion in poly(N-vinyl pyrrolidone) - poly(ethylene glycol) systems*. *Colloid and Polymer Science*, **2001**. 279(6): p. 532-538.
144. Johansson, L., U. Shantze, and J.E. Lofroth, *Diffusion and interaction in gels and solutions. 2. Experimental results on the obstruction effect*. *Macromolecules*, **1991**. 24(22): p. 6019-6023.
145. Trampel, R., J. Schiller, L. Naji, F. Stallmach, J. Kärger, and K. Arnold, *Self-diffusion of polymers in cartilage as studied by pulsed field gradient NMR*. *Biophysical Chemistry*, **2002**. 97(2-3): p. 251-260.
146. Newling, B., *Pulsed field gradient NMR study of the diffusion of H₂O and polyethylene glycol polymers in the supramolecular structure of wet cotton*. *Journal of Physical Chemistry B*, **2003**. 107: p. 12391-12397.

147. Walther, B., N. Loren, M. Nyden, and A.M. Hermansson, *Influence of kappa-carrageenan gel structures on the diffusion of probe molecules determined by transmission electron microscopy and NMR diffusometry*. *Langmuir*, **2006**. 22(19): p. 8221-8228.
148. Colsenet, R., O. Soderman, and F. Mariette, *Effects of ionic strength and denaturation time on polyethyleneglycol self-diffusion in whey protein solutions and gels visualized by nuclear magnetic resonance*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(14): p. 5105-5112.
149. Colsenet, R., O. Soderman, and F.O. Mariette, *Pulsed field gradient NMR study of poly(ethylene glycol) diffusion in whey protein solutions and gels*. *Macromolecules*, **2006**. 39(3): p. 1053-1059.
150. Colsenet, R., O. Soderman, and F. Mariette, *Effect of casein concentration in suspensions and gels on poly(ethylene glycol)s NMR self-diffusion measurements*. *Macromolecules*, **2005**. 38(22): p. 9171-9179.
151. Lafitte, G., O. Soderman, K. Thuresson, and J. Davies, *PGF-NMR diffusometry: A tool for investigating the structure and dynamics of noncommercial purified pig gastric mucin in a wide range of concentrations*. *Biopolymers*, **2007**. 86(2): p. 165-175.
152. Mariette, F., D. Topgaard, B. Jönsson, and O. Söderman, *¹H NMR diffusometry study of water in casein dispersion and gels*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50(15): p. 4295-4302.
153. Jönsson, B., H. Wennerstrom, P.G. Nilsson, and P. Linse, *Self-diffusion of small molecules in colloidal systems*. *Colloid & Polymer Science*, **1986**. 264: p. 77-88.
154. Masaro, L. and X.X. Zhu, *Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids*. *Progress in Polymer Science*, **1999**. 24: p. 731-775.
155. Muhr, A.H. and J.M. Blanchard, *Diffusion in gels*. *Polymer*, **1982**. 23: p. 1012.
156. Mackie, J.S. and P. Meares, *The diffusion of electrolytes in a cation-exchange resin membrane. I. Theoretical*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, **1955**. 232: p. 498-509.

157. Amsden, B., *Solute diffusion in hydrogels. An examination of the retardation effect.* Polymer Gels and Networks, **1998**. 6(13).
158. Park, H., C.S. Johnson, and D.A. Gabriel, *Probe diffusion in polyacrylamide gels as observed by means of holographic relaxation methods.* Macromolecules, **1990**. 23: p. 1548-1553.
159. De Smedt, S.C., A. Lawers, and J. Demeester, *Structural information on hyaluronic acid solutions as studied by probe diffusion experiments.* Macromolecules, **1994**. 27: p. 141-146.
160. Babu, S., J.-C. Gimel, and T. Nicolai, *Tracer diffusion in colloidal gels.* e-print cond-mat/0705.1266v1.
161. De Gennes, P.G., *Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles.* Journal of Chemical Physics, **1971**. 55(2): p. 572 -579.
162. De Gennes, P.G., *Brownian motions of flexible polymer chains.* Nature, **1979**. 282: p. 367 - 370.
163. Callaghan, P.T., K.W. Jolley, and R.S. Humphrey, *Diffusion of fat and water in cheese as studied by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance.* Journal of Colloid and Interface Science, **1983**. 93: p. 521-529.
164. Godefroy, S. and P.T. Callaghan, *2D relaxation/diffusion correlations in porous media.* Magnetic Resonance Imaging, **2003**. 21: p. 381-383.
165. Colsonet, R., M. Cambert, and F. Mariette, *NMR relaxation and water self-diffusion studies in whey protein solutions and gels.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**. 53: p. 6784-6790.
166. Gottwald, A., L.K. Creamer, P.L. Hubbard, and P.T. Callaghan, *Diffusion, relaxation, and chemical exchange in casein gels: A nuclear magnetic resonance study.* Journal of Chemical Physics, **2005**. 122(3): p. 034506.1-034506.10.

Chapitre II

Matériels & Méthodes

Préambule

Les matières premières, les méthodes et les protocoles utilisés sont décrits dans chacun des articles. Le but de ce chapitre n'est donc pas de lister à nouveau ces données mais d'apporter des précisions sur les méthodes qui ont été employées et les validations techniques qui ont été réalisées.

1. Echantillons pour les expériences à l'équilibre et en continu

Tous les échantillons étaient préparés à partir d'une poudre de PPCN (PhosPhoCaseinate Natif) qui est majoritairement constituée de micelles de caséines. La réhydratation a été conduite avec du D₂O pour les mesures de diffusion dans des systèmes équilibrés, c'est-à-dire avant et après la coagulation des suspensions. Pour les mesures en cinétique, la réhydratation a été réalisée avec de l'eau. Selon le type des échantillons préparés, les méthodes et les protocoles variaient :

- Tous les gels acides ont été obtenus par ajout de Glucono-Delta-Lactone (GDL) de manière à ce que les gels aient un pH ou un pD (équivalent du pH dans D₂O) final d'environ 4,6-4,5. Rappelons que, une fois dissoute, la GDL s'hydrolyse progressivement en acide gluconique qui acidifie le milieu.
- Les gels dits « présure » ont été réalisés en ajoutant de la chymosine Chymax-Plus (Chr Hansen, Arpajon, France). Toutefois, les gels présure à base de D₂O, qui étaient réalisés à 30°C pendant 2 h 30, étaient formés trop rapidement pour permettre de suivre la diffusion des PEGs pendant la coagulation. En effet, les mesures de diffusion duraient entre 10 et 15 minutes. Aussi, afin de pouvoir réaliser des suivis cinétiques par PFG-RMN, les coagulations présure ont été ralenties (i.e. pour les échantillons à base d'H₂O). Pour cela, la température a été réduite (à 20°C) ainsi que la quantité d'enzyme ajoutée.
- Les gels dits « mixtes » ont été obtenus en combinant les protocoles de coagulation acide et présure, c'est-à-dire que les mêmes quantités de chymosine et de GDL ont été ajoutées simultanément aux suspensions de micelles de caséines.

La grande majorité des mesures ont été réalisées sur des produits concentrés. Pour les études en statique, les concentrations variaient entre environ 5 et 15 g de caséines pour 100 g de D₂O. Pour les études en cinétique, les concentrations utilisées étaient d'environ 16 g de caséines pour 100 g d'H₂O. Le **Tableau 1** résume les conditions de coagulation et les quantités d'agents gélifiants ajoutées à 10 g des solutions concentrées.

Protocoles	Analyse	Echantillons	GDL (mg)	Chymosine (µL)	Température
Coagulation "rapide" dans D₂O	Statique	acide	545	-	20°C
		présure	x	336 (d'une dilution au 1/100 ^{ème})	30°C pendant 2h30
		mixte	545	336 (d'une dilution au 1/100 ^{ème})	30°C pendant 2h30
Coagulation "lente" dans H₂O	Cinétique	acide	410	-	20°C
		présure	x	70 (d'une dilution au 1/100 ^{ème})	20°C
		mixte	410	70 (d'une dilution au 1/100 ^{ème})	20°C

Tableau 1 : Récapitulatif des échantillons concentrés réalisés (les quantités de GDL et de chymosine étaient ajoutées à 10 g de solution).

Notons également que les gels à base de D₂O ont été analysés par RMN le lendemain de l'ajout des agents gélifiants pour les gels présure et mixte, et le surlendemain pour les gels acides qui étaient beaucoup plus lents à se former. Les données de diffusion ont été confrontées aux structures de ces gels par l'intermédiaire d'images de MEB.

Les études en cinétique étaient quant à elles réalisées sur des périodes d'environ 16-36 h. En parallèle des mesures RMN, les processus de coagulation ont été caractérisés par rhéométrie ainsi que par des mesures de pénétrométrie et des images de MEB après la formation des gels.

Aucune synérèse n'a été constatée sur la durée de ces expériences.

2. Les mesures de rhéologie

Deux approches complémentaires ont été employées pour caractériser l'évolution des propriétés rhéologiques lors des études en cinétique de la coagulation acide, présure et mixte. L'une d'elles permet de suivre l'évolution des propriétés viscoélastiques des systèmes au cours des coagulations par une méthode non destructive en utilisant un rhéomètre. L'autre permet de mesurer des paramètres de textures seulement à l'état gélifié, par un système de pénétrométrie.

2.1. Les mesures au rhéomètre

2.1.1. Principe

Le principe de la rhéométrie consiste à imposer une déformation (ε) fonction sinusoïdale du temps et à mesurer la contrainte (τ) correspondante :

$$\varepsilon = \varepsilon_0 \cos \omega t$$

$$\tau = \tau_0 \cos (\omega t + \delta)$$

ε_0 est la déformation de cisaillement maximale, τ_0 la contrainte de cisaillement maximale qui lui est associée, et δ qui représente le déphasage entre la déformation et la contrainte est appelée l'angle de perte.

La représentation de la contrainte et de la déformation par des vecteurs tournants conduit à l'utilisation des nombres complexes :

$$\tau^* = \tau_0 (\cos (\omega t + \delta) + i \sin (\omega t + \delta))$$

$$\varepsilon^* = \varepsilon_0 (\cos \omega t + i \sin \omega t)$$

Le rapport τ^*/ε^* représente le module complexe G^* . Il traduit la résistance générale du produit à la déformation et se décompose en deux parties : une composante élastique réelle G' et une composante visqueuse imaginaire G'' :

$$\tau^*/\varepsilon^* = G^* = G' + i G''$$

Un exemple du profil d'évolution des modules G' et G'' au cours du temps est illustré en **Figure 1**.

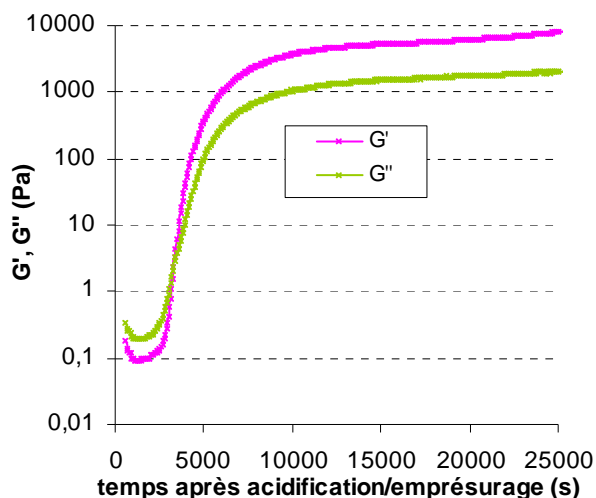


Figure 1 : Profil d'évolution des modules G' et G'' d'un gel mixte obtenu à l'aide d'un rhéomètre.

Les courbes se décomposent en trois phases. La première est caractérisée par la prédominance de G'' sur G' , elle traduit un comportement visqueux supérieur au comportement élastique. La deuxième phase correspond à la transition sol/gel de l'échantillon. G' et G'' augmentent fortement et le rapport des modules s'inverse. Le « temps de gélification » a été défini comme étant le moment où $G' = G''$. Enfin la troisième phase est caractérisée par la prédominance de G' sur G'' , elle traduit un comportement élastique supérieur au comportement visqueux.

2.1.2. Conditions de mesure

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée Rheostress RS150 (Haake, Allemagne) équipé d'une géométrie DG41 à cylindres coaxiaux à double entrefer. Environ 10 mL de solution étaient d'abord déposés dans l'entrefer de la géométrie, préalablement thermostaté à 20°C. Après avoir remonté la géométrie, environ 10 mL de solution était à nouveau ajoutés pour obtenir un recouvrement total des cylindres. Enfin, la surface des échantillons était recouverte d'une couche d'huile afin d'éviter toute dessiccation durant les cinétiques de coagulation.

2.2. Les mesures de pénétrométrie

2.2.1. Principe

Ces méthodes permettent de déterminer les propriétés texturales d'un produit sachant que la texture est définie comme étant l'ensemble des propriétés mécaniques, géométriques et de surface d'un produit, perceptibles par les mécanorécepteurs, les récepteurs tactiles et éventuellement par les récepteurs visuels et auditifs. Les propriétés mécaniques sont celles liées à la réaction du produit à une contrainte. Elles sont divisées en cinq caractéristiques primaires : la dureté, la cohésion, la viscosité, l'élasticité et l'adhérence. Les propriétés géométriques, sont celles liées aux dimensions, à la forme et à l'arrangement des particules dans un produit. Enfin, les propriétés de surface sont celles liées aux sensations telles que celles produites par l'eau et la matière grasse.

Les paramètres de texture sont souvent mesurés en utilisant un appareil d'Instron. Plusieurs caractéristiques mécaniques peuvent être ainsi déterminées comme :

- La rigidité : pente initiale du profil de pénétration (N/mm).
- La dureté : force après fracture, au maximum de déplacement lors de la pénétration (N).
- La fracturabilité : force de réaction à la fracture de l'échantillon (N).
- Le « collant » : énergie qui permet de dépasser les forces d'attractions entre la surface de l'échantillon et la surface d'autres matériaux avec lesquels l'échantillon est en contact (mJ).

2.2.2. Conditions de mesure

Afin de déterminer le protocole d'étude le plus de sensible, des tests préliminaires ont été effectués sur un gel mixte, système dont le temps de prise est le plus rapide. Ces tests consistent à faire des mesures de pénétrométrie en faisant varier le diamètre de la sonde et la vitesse de pénétration tout en maintenant un enfoncement constant de 8 mm. Cette étude préliminaire a révélé que la sonde de 12,5 mm de diamètre opérant à une vitesse de 100 mm/min était la mieux adaptée à nos systèmes. Toutes les mesures à l'Instron ont donc été réalisées en utilisant ces paramètres.

Après ajout de l'agent coagulant, la solution était divisée en plusieurs parts égales de 15 mL dans des flacons en plastique. Les mesures ont été effectuées lorsque les échantillons devenaient suffisamment élastiques, c'est-à-dire entre environ 1,5 et 2 fois le temps de gélification ($G' = G''$).

3. La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Pour chaque type de gel fabriqué, le protocole de préparation des échantillons pour la réalisation des expériences au MEB était le même. Les gels étaient découpés à l'aide d'un cutter en petits cubes (5 x 5 x 5 mm) et immergés dans du glutaraldéhyde dilué à 2,5 % (v/v) dans du tampon cacodylate de sodium à pH 7,2. Les échantillons ont été conservés à 4°C pendant 48 heures. Pendant cette période, le bain était renouvelé deux fois. Les échantillons étaient ensuite rincés plusieurs fois dans le tampon à pH 7,2 puis dans de l'eau distillée pour éliminer tout le glutaraldéhyde. Enfin, les échantillons étaient déshydratés dans une série de bains d'éthanol/eau à 60, 70, 80, 90, 95 et 100 % d'éthanol (v/v) pendant 20 minutes à chaque étape, avant de finir par un bain d'acétone 100 % (v/v).

Les échantillons étaient ensuite apportés au Centre de Microscopie Electronique à Balayage et microAnalyse (CMEBA) de Rennes (France) où ils subissaient un séchage par la méthode du point critique du CO₂ (CPD 010, Balzers Union Ltd, Liechtenstein). Les échantillons, une fois séchés, étaient collés avec un adhésif double-face, fracturés, puis métallisés à l'or-palladium par pulvérisation cathodique. Ces étapes permettent de rendre les échantillons conducteurs. Les échantillons étaient alors analysés au microscope électronique à balayage à effet de champ (Jeol JSM 6301F) opérant à 9 kV.

4. Méthodes de mesure RMN

4.1. Mesures à bas champ

Les coefficients de diffusion de l'eau ont été mesurés avec un spectromètre RMN bas champ équipé d'un aimant permanent de 0,47 Tesla (The Minispec, Bruker Spectroscopy, Wissembourg, France), opérant à une fréquence de 20 MHz pour les protons. Cet appareil est équipé d'une unité de gradient pulsé pouvant aller jusqu'à des intensités de gradients de 4 T/m. Il requiert l'utilisation de tubes de 1 cm de diamètre externe (soit 0,8 cm de diamètre interne),

remplis de 0,5 mL (hauteur d'environ 1 cm) pour laquelle l'homogénéité de l'aimant a été vérifiée. Toutes les mesures ont été réalisées à 20°C, l'antenne de mesure étant thermostatée à l'aide d'azote liquide.

Les coefficients de diffusion de l'eau ont été déterminés avec la séquence d'écho de spin en utilisant 4 scans, $\delta = 0,5$ ms et $\Delta = 5$ ms. Le délai entre la première impulsion à 90° et le premier gradient appliqué était fixé à 1 ms. Les mesures ont été réalisées en gardant δ et Δ constants et en utilisant 10 valeurs de g comprises entre 0,6 et 3,2 T/m. Le délai de répétition était fixé à cinq fois le T_1 de l'eau. L'intensité des gradients était préalablement calibrée par la mesure du coefficient de diffusion de l'eau pure à 20°C.

La répétabilité de la mesure, avec les paramètres ci-dessus, a été étudiée durant une nuit avec un échantillon d'eau contenant 0,1 M de NaCl. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 2**.

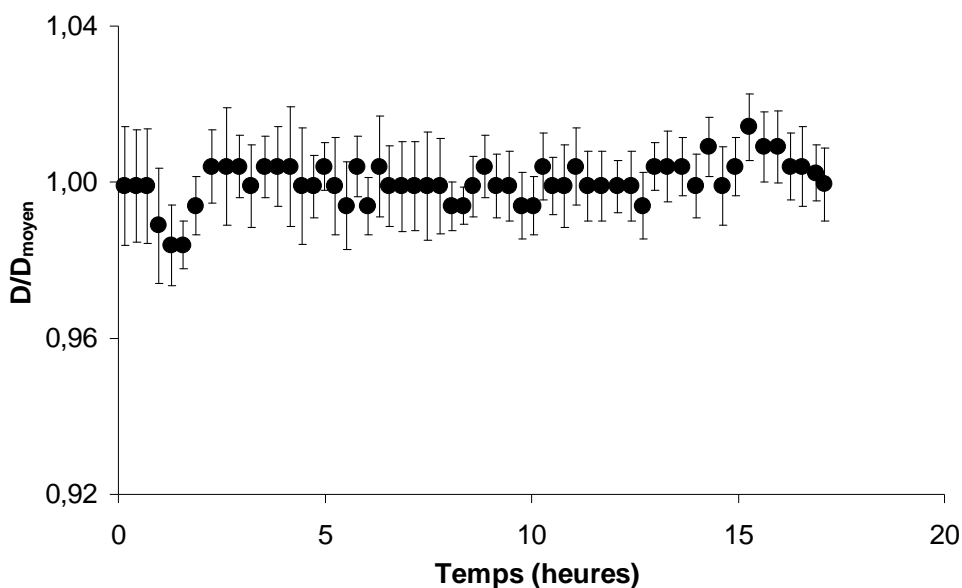


Figure 2 : Répétabilité de la mesure du coefficient de diffusion de l'eau avec le spectromètre bas champ.

Aucune dérive dans le temps n'a été observée et la répétabilité des mesures a été trouvée très bonne puisque l'écart type mesuré sur les valeurs était de 0,5 %.

4.2. Mesures à haut champ

Les coefficients de diffusion des PEGs et de HOD ont été mesurés à l'aide d'un spectromètre Bruker 500 MHz équipé d'une sonde à gradient de champ pulsé Diff-30, et avec des tubes RMN de 5 mm rempli jusqu'à une hauteur d'environ 4 cm. Toutes les mesures ont été réalisées à 20°C. La régulation thermique était assurée par le circuit d'eau qui circule autour de la bobine gradient. Une calibration préalable en température a été réalisée, en plaçant à l'intérieur d'un tube RMN rempli d'eau, une fibre optique calibrée par rapport à un thermocouple de référence. Ceci nous a permis de calculer le décalage existant entre la valeur affichée par le thermocouple et la température réelle à l'intérieur de l'échantillon (il était de 0,3°C à 20°C).

4.2.1. A l'équilibre – Echantillons D₂O

Les mesures ont été réalisées à l'aide de la séquence STE-BBP-LED (paragraphe 2.4.2. du *chapitre I*). Cette séquence a été choisie pour supprimer les problèmes liés à la présence de courant de Foucault qui étaient observés avec les séquences classiques (PFG-SE et PFG-STE). Les expériences ont été conduites en utilisant 16 valeurs de gradient allant de ~ 0,25 à 6,00 T/m et en gardant la durée d'impulsion de gradient constante à 1,0 ms. Selon le poids moléculaire de la sonde, l'intervalle de diffusion Δ était ajusté de manière à sonder une distance proche de 1,5 μm , en accord avec l'équation d'Einstein $z = (2.D.\Delta)^{1/2}$. Seize scans étaient réalisés et le délai de recyclage était fixé à cinq fois le T₁ du PEG.

Notons également que chaque jour d'expériences, le coefficient de diffusion du PEG de 96750 g/mol dans du D₂O était mesuré afin de s'assurer de la répétabilité des mesures dans le temps. L'écart type sur ces mesures est d'environ 3 % (sur une période d'environ 1 an et demi).

4.2.2. En continu – Echantillons H₂O

Les coefficients de diffusion ont été déterminés avec la séquence STE-BPP qui intègre un schéma WATERGATE 3-9-19 et qui a été présenté dans le paragraphe 2.4.3. du *chapitre I*. Cette séquence a été utilisée car elle permet de supprimer de façon remarquable le signal de l'eau tout en conservant une très bonne élimination des courants de Foucault. La **Figure 3** ci-dessous permet de visualiser les effets de cette séquence sur les spectres de diffusion :

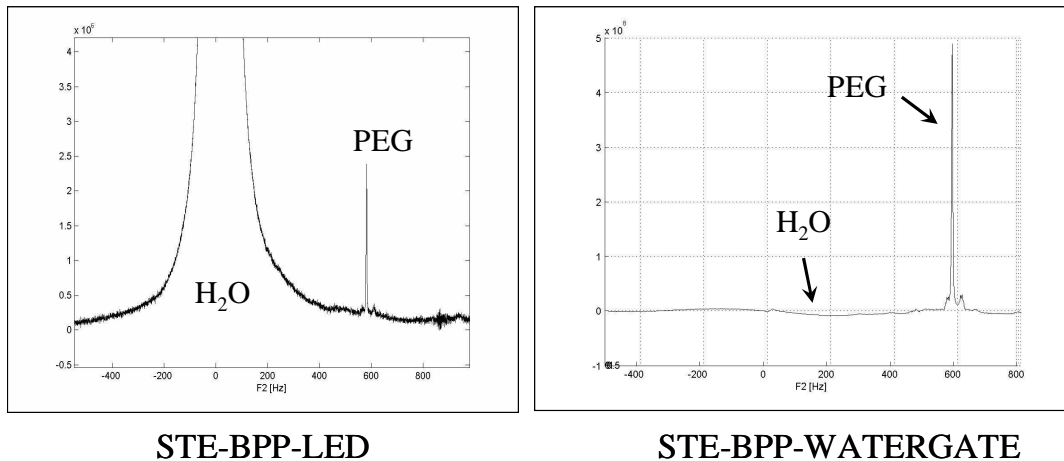
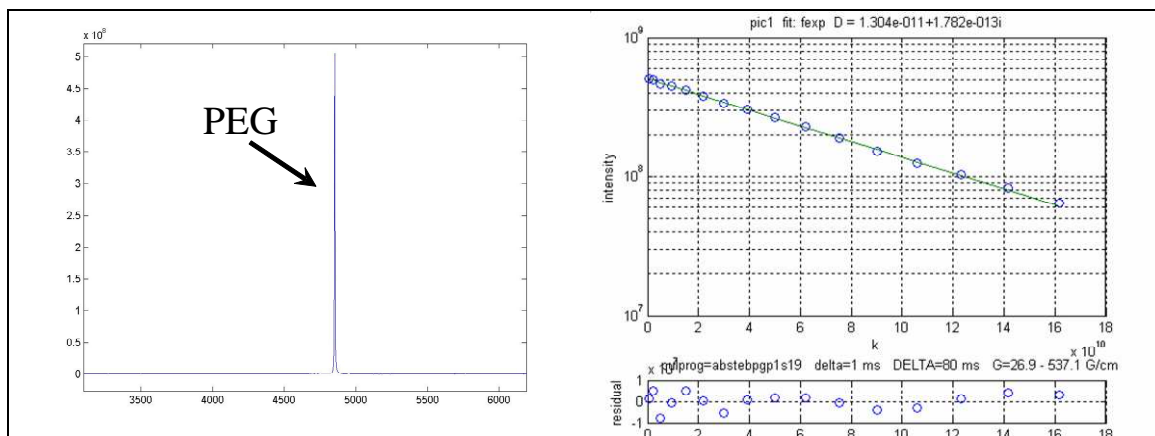


Figure 3 : Exemple de spectres obtenus pour un PEG dans H₂O avec la séquence STE-BPP-LED (à gauche) et avec la séquence STE-BPP-WATERGATE (à droite).

Afin de s’assurer que cette séquence n’introduisait pas de biais significatif, les coefficients de diffusion d’un PEG dans du D₂O mesurés à l’aide de la séquence STE-BPP-LED et STE-BPP-WATERGATE ont été comparés. Les résultats sont présentés en Figure 4 :



STE-BPP-LED	$1,350 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
STE-BPP-WAERGATE	$1,304 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

Figure 4 : Comparaison du coefficient de diffusion d’un PEG dans du D₂O mesuré avec les séquences STE-BPP-LED et STE-BPP-WATERGATE. Le spectre RMN et l’atténuation du signal, obtenus avec la séquence STE-BPP-WATERGATE, sont également représentés.

On constate que le coefficient de diffusion mesuré avec la STE-BPP-WATERGATE était 3,4 % en deçà de la valeur attendue. Cette différence est donc du même ordre de grandeur que l’écart type des mesures réalisées avec la séquence STE-BPP-LED (environ 3 %). La mesure du coefficient de diffusion d’un PEG avec la séquence STE-BPP-

WATERGATE est donc satisfaisante. De plus, toutes les valeurs déterminées à l'aide de cette séquence ont été normalisées par le coefficient de diffusion mesuré dans la solution initiale. Ainsi, les données obtenues en continu ne sont discutées qu'en termes d'évolution de la diffusion des PEGs au cours des coagulations et non en termes de justesse des valeurs.

La répétabilité de ces mesures dans le temps a également été étudiée sur une période similaire aux expériences en continu. Pour cela, le coefficient de diffusion d'un PEG de 620 g/mol dans H₂O a été mesuré de façon répétée pendant toute une nuit. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 5**.

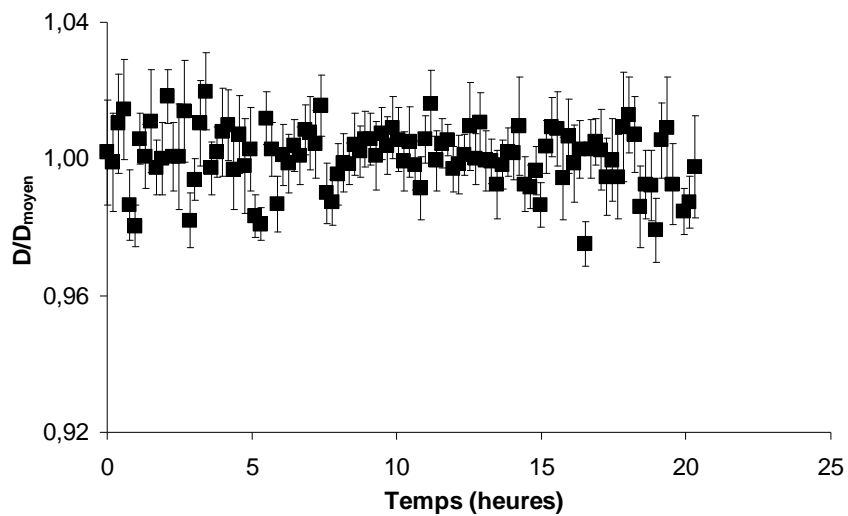


Figure 5 : Répétabilité de la mesure du coefficient de diffusion d'un PEG dans H₂O avec la séquence STE-BPP-WATERGATE.

Ces résultats montrent que la séquence utilisée est stable dans le temps et que la répétabilité de la mesure est satisfaisante puisque l'écart type calculé sur ces mesures est de 1,04%. Cette méthode a donc été utilisée pour suivre l'évolution de la diffusion des PEGs au cours des processus de coagulation.

Les résultats obtenus avec cette approche ont été acquis en utilisant 16 valeurs de gradient allant de ~ 0,25 à 5,00 T/m et en gardant la durée d'impulsion de gradient constante à 1,0 ms. Selon le poids moléculaire de la sonde, l'intervalle de diffusion Δ était ajusté de manière à sonder une distance proche de 1,5 μ m, en accord avec l'équation d'Einstein $z = (2.D.\Delta)^{1/2}$. Seize scans étaient acquis et le délai de recyclage était fixé à trois T_1 .

5. Traitement des données RMN

Les fichiers bruts de mesures ont tous été traités avec des programmes de traitements sous Matlab qui ont été initialement élaborés à l'Université de Lund et qui ont été modifiés en fonction de nos besoins. Les coefficients de diffusion ont été déterminés en réalisant des régressions exponentielles sur les intensités de la raie d'intérêt. L'erreur sur la valeur des coefficients de diffusion était calculée avec un algorithme de Monte Carlo avec 200 itérations. Les différentes équations qui ont été utilisées pour réaliser les régressions sont présentées dans les articles. Seule la méthode employée pour déterminer les coefficients de diffusion des PEGs dans les gels acide et mixte est présentée ci-après puisque celle-ci n'a été que rapidement décrite dans les publications.

5.1. Effet du pH sur la diffusion des PEGs

Afin de s'assurer que les variations de l'acidité n'induisaient pas de modification de la diffusion des sondes, la diffusion d'un PEG de 96750 g/mol a été mesurée pour différentes acidités dans du D₂O. Celles-ci étaient obtenues en ajoutant quelques gouttes d'une dilution d'acide chlorhydrique. Les résultats sont illustrés en **Figure 6** et montrent que la diffusion du PEG de 96750 g/mol n'est pas affectée par des modifications d'acidité. Par la suite, nous avons donc considéré que les changements de pH (ou de pD) n'avaient aucun effet direct sur la diffusion des PEGs.

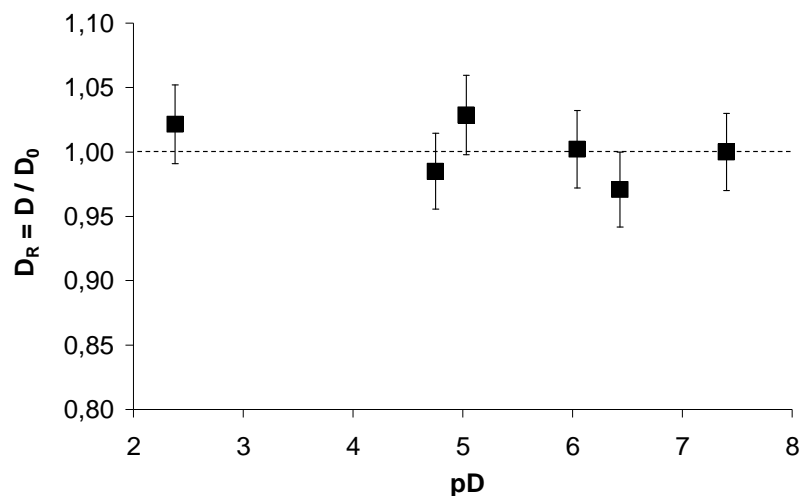


Figure 6 : Effet de l'acidité sur la diffusion d'un PEG de 96750 g/mol.

5.2. Effet de l'acide gluconique sur la diffusion des PEGs

Les quantités de GDL ajoutées aux échantillons pour atteindre un pH (ou pD) d'environ 4,5 représentaient environ 5 % de la matière sèche totale de l'échantillon (**Tableau 1**). Aussi, nous avons cherché à déterminer l'influence de ces ajouts sur la diffusion de chacun des PEGs. Comme illustré en **Figure 7**, l'effet était le même quelle que soit la taille du PEG ou le solvant utilisé. Une régression linéaire a donc été réalisée sur les données. L'équation de cette droite a par la suite été utilisée pour corriger les coefficients de diffusion des PEGs en présence d'acide gluconique (qui est issu de l'hydrolyse de la GDL).

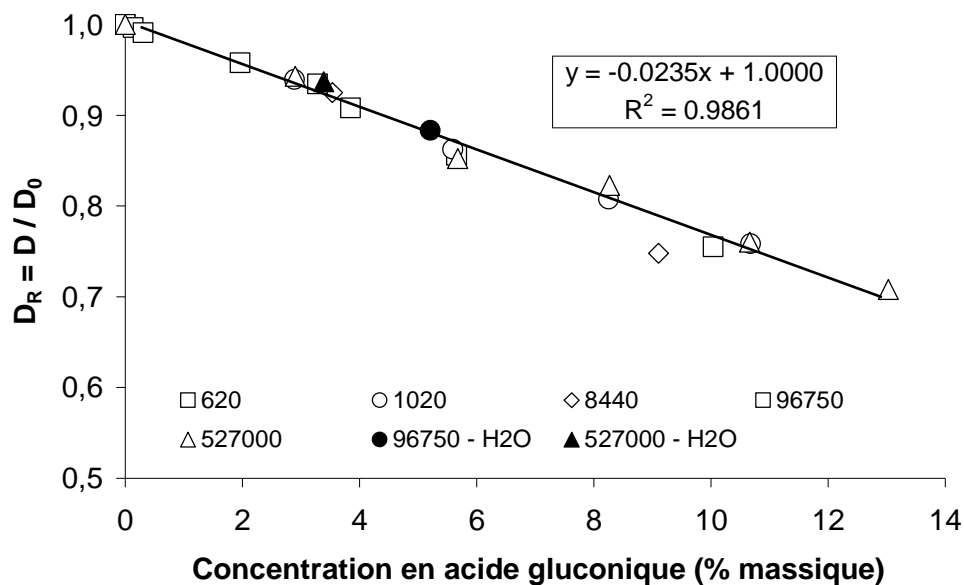


Figure 7 : Effet de l'ajout de l'acide gluconique sur la diffusion des PEGs.

5.3. Effet de l'acide gluconique sur le traitement des données

Dans les spectres de diffusion des gels acides et mixtes, il s'est avéré que l'acide gluconique, provenant de l'hydrolyse de la GDL, présentait un signal RMN qui se superposait avec la raie du PEG à 3,6 ppm comme illustré en **Figure 8**.

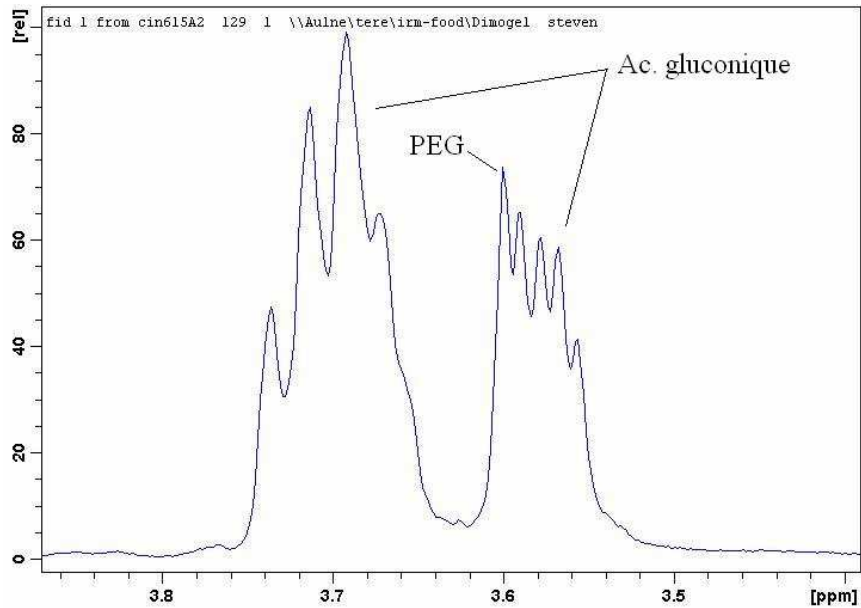


Figure 8 : Superposition du signal du PEG et du signal de l'acide gluconique à 3,6 ppm.

Comme décrit dans le paragraphe **2.5.2.** du *chapitre I*, de telles données peuvent être analysées en utilisant l'équation suivante :

$$E = P_1 \cdot \exp(-kD_1) + P_2 \cdot \exp(-kD_2) \quad 1$$

avec E l'atténuation, P_1 et P_2 les contributions relatives du signal du PEG et de l'acide gluconique et D_1 et D_2 les coefficients de diffusion de ces deux espèces. Les coefficients de diffusion des PEGs ayant une masse moléculaire égale ou supérieure à 8440 g/mol ont été déterminés à l'aide de cette équation, ou en ne tenant pas compte des deux ou trois premiers spectres (après lesquels le signal de l'acide gluconique devenait nul). Cependant, cette équation ne permettait pas d'obtenir les coefficients de diffusion des PEGs de 620 et 1020 g/mol car ils étaient trop proches de celui de l'acide gluconique. Des essais ont été réalisés avec les logiciels Core et MaxEnt, qui ont été spécialement conçus pour ce type de problème, mais ils se sont révélés infructueux. Nous avons donc opté pour une autre approche qui diffère légèrement selon que les analyses aient été réalisées à l'équilibre ou au cours des processus de coagulation.

5.3.1. A l'équilibre – Echantillons D_2O

Le coefficient de diffusion de l'acide gluconique a été mesuré à partir d'une raie spécifique de ce dernier et réinjecté dans l'**eq 1**. Cette méthode n'étant pas suffisante, les proportions P_1 et P_2 ont été estimées en prenant pour référence l'aire du signal des caséines à 1,2 ppm dans les spectres en solution (**Figure 9**) et à l'état gélifié. Ces valeurs ont également

été réinjectées dans l'eq 1 afin d'obtenir une estimation des coefficients de diffusion des PEGs 620 et 1020 g/mol dans les gels acides et mixtes.

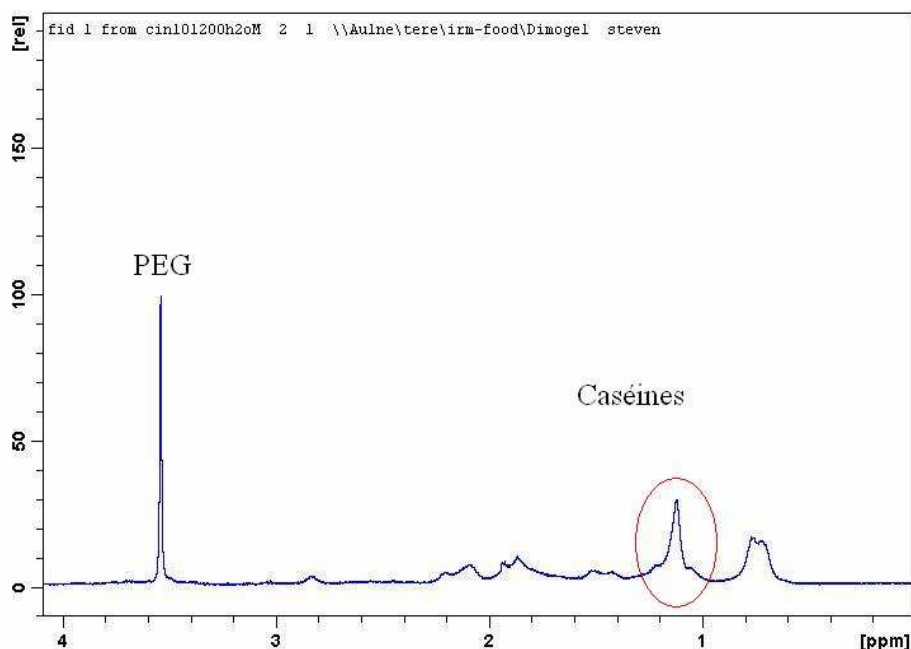


Figure 9 : Spectre RMN d'un PEG dans une suspension de caséines.

Il aurait été préférable d'ajouter une autre molécule dans les échantillons pour servir de référence dans les spectres RMN. En effet, le signal utilisé (comme tous les signaux des caséines) présente de légères variations de forme entre l'état liquide et l'état gélifié. Néanmoins, l'erreur induite par ces modifications est négligeable devant nos observations (voir le *chapitre III*).

5.3.2. En continu – Echantillons H₂O

Seul le PEG 620 g/mol a été utilisé comme sonde de petite taille lors des analyses en continu. Le principe de la méthode décrite plus haut est le même mais les coefficients de diffusion de ce PEG ont pu être estimés avec plus de précision. En effet, la GDL, qui est ajoutée aux matrices caséiques, s'hydrolyse progressivement en acide gluconique ce qui induit une décroissance relativement lente du pH. Néanmoins, si l'acide gluconique « pollue » le signal des PEGs à 3,6 ppm, ce n'est pas le cas de la GDL. Aussi, lors des premières mesures de diffusion après l'ajout de la GDL, la raie du PEG et la raie des caséines à 1,2 ppm n'étaient donc que peu perturbées (**Figure 10**). La surface de la raie des caséines à 1,2 ppm a donc de nouveau été utilisée comme référence, mais seulement dans le premier spectre acquis

après ajout de la GDL. Cette méthode nous permettait donc d'estimer la proportion d'acide gluconique au début de la cinétique d'acidification.

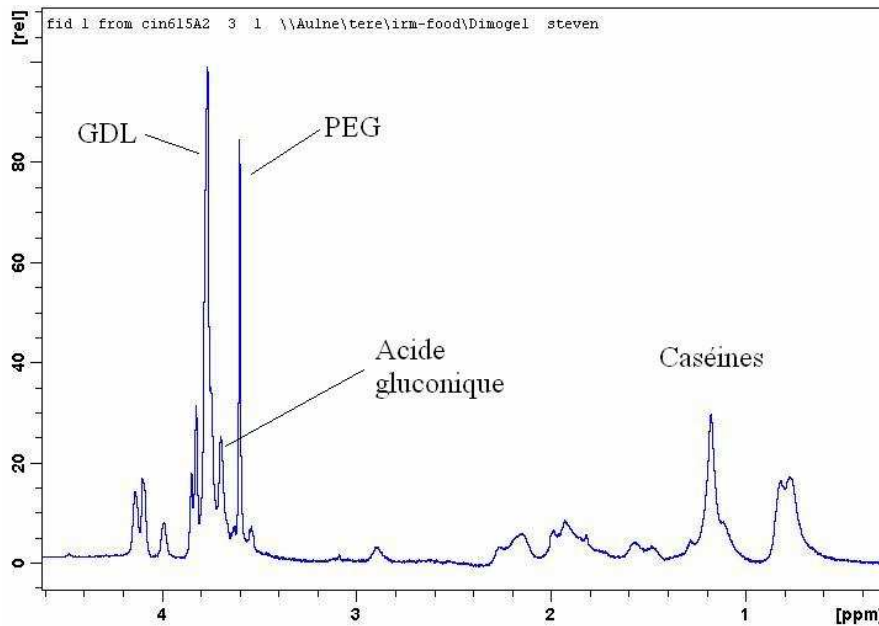


Figure 10 : Spectre RMN du PEG 620 g/mol dans une suspension de caséines juste après l'ajout de la GDL.

Ensuite, la proportion croissante d'acide gluconique superposée au signal du PEG a été calculée en supposant que l'aire de la raie du PEG restait constante tout au long des cinétiques d'acidification. Cette hypothèse a été vérifiée en mesurant l'évolution de l'aire des PEGs au cours de la coagulation présure. Seule une légère variation de l'aire des PEGs, de l'ordre de 4 %, a été observée. Nous avons donc fait l'hypothèse que le signal du PEG était constant. Ainsi, l'augmentation de l'aire de la raie à 3,6 ppm au cours des cinétiques d'acidification a été entièrement attribuée à la formation de l'acide gluconique suite à l'hydrolyse de la GDL. La contribution de l'acide gluconique au signal du PEG a donc été calculée par la relation suivante :

$$P_{Ac.Gluconique} = \frac{Aire_{totale} - Aire_{PEG}}{Aire_{totale}} \quad 2$$

Un exemple illustrant la contribution estimée de l'acide gluconique au signal à 3,6 ppm au cours d'une coagulation acide est présentée en **Figure 11**.

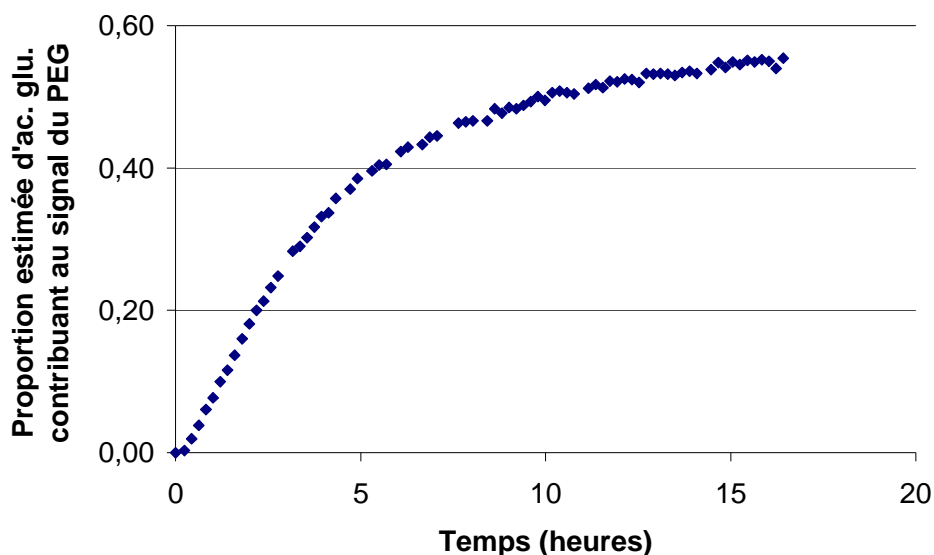


Figure 11 : Augmentation de la contribution estimée de l'acide gluconique au signal RMN à 3,6 ppm au cours d'une coagulation acide.

Les valeurs de ces contributions et le coefficient de diffusion de l'acide gluconique, mesuré sur un signal spécifique de celui-ci, ont alors été réinjectés dans l'**eq. 1** pour déterminer le coefficient de diffusion du PEG 620 g/mol au cours des coagulations acide et mixte.

Bien que cette méthode de traitement puisse être critiquée, c'est la seule qui nous ait permis d'obtenir une évolution cohérente de la diffusion du PEG de 620 g/mol au cours des cinétiques de coagulation acide et mixte. De plus, la validité de cette méthode a pu être confortée puisque le coefficient de diffusion de l'acide gluconique (180 g/mol), issu d'un signal isolé, évoluait toujours de la même façon que celui du PEG de 620 g/mol au cours de ces coagulations. Un exemple est donné en **Figure 12**.

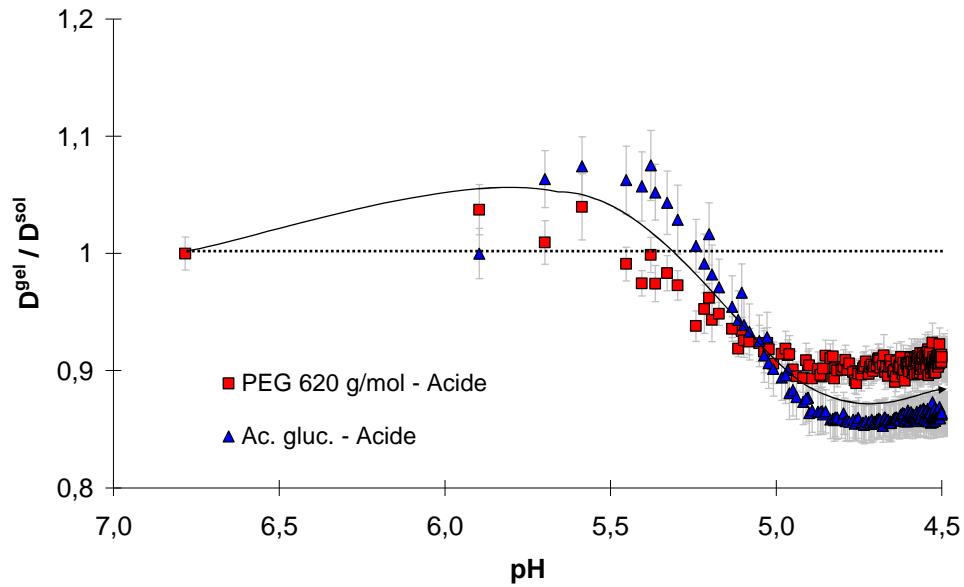


Figure 12 : Evolutions des coefficients de diffusion normalisés de l'acide gluconique et du PEG de 620 g/mol en fonction du pH au cours d'une coagulation acide.

La diffusion des deux espèces présentant le même profil, il semble que l'évolution de la diffusion du PEGs de 620 g/mol est globalement bien déterminée.

Chapitre III

Publication n°1 :

Effet de la microstructure
des gels de caséines
sur la diffusion de
molécules-sonde

Effet de la microstructure des gels de caséines sur les coefficients de diffusion de molécules-sonde mesurés par ^1H -PFG-RMN

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article accepté à paraître dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Récemment, Colsenet *et al.*¹ ont observé que la coagulation des micelles de caséines par la présure induisait une forte augmentation des coefficients de diffusion de PEGs ayant des masses moléculaires importantes (82250 et 634000 g/mol). En revanche, la diffusion des PEGs ayant une masse moléculaire inférieure ou égale à 8500 g/mol n'était pas modifiée. Ces résultats ont ainsi démontré que la diffusion de certaines molécules était affectée par des effets de structure de la matrice. L'explication avancée par les auteurs était une baisse du volume occupé par les particules caséiques après la coagulation.

Le but de cette étude est d'étoffer cette approche en comparant la diffusion de PEGs de tailles comparables dans des matrices présentant des microstructures différentes. Pour cela, la diffusion des sondes a été mesurée par RMN dans des suspensions de micelles de caséines ayant différentes concentrations, dans les gels acides correspondants et dans des gels présure et mixte concentrés. L'ensemble des résultats est discuté en fonction de la taille des sondes et des structures des gels, caractérisées par des images de microscopie électronique à balayage.

Ils montrent que si la diffusion des petites molécules ne semble pas affectée par le type de coagulation, et donc par la structure des matrices, celle des sondes de taille importante est d'autant plus augmentée après gélification que la porosité des gels est grande. Ces résultats sont expliqués en considérant que selon leur taille, les PEGs peuvent ou ne peuvent pas diffuser au travers des agrégats caséiques. Les sondes de grande taille ne pourraient diffuser qu'autour des agrégats caséiques. Par conséquent, celles-ci diffuseraient d'autant plus rapidement que l'accroissement de la porosité des gels, qui est connue pour s'opérer au cours de leur vieillissement, est intense.

Impact of casein gel microstructure on self-
diffusion coefficient of molecular probes measured
by ^1H PFG-NMR

*Steven Le Feunteun, François Mariette**

Cemagref, Process Engineering Technology Research Unit, CS 64426, 17 avenue de Cucillé,
35044 Rennes, Cedex, France

* Corresponding author:

François Mariette

Tel: 33 (0)223482121

Fax: 33(0)223482115

E-mail address: Francois.Mariette@cemagref.fr

ABSTRACT

The translational dynamics of poly(ethylene glycol) (PEG) polymers with molecular weights varying from $6 \cdot 10^2$ to $5 \cdot 10^5$ were investigated by pulsed field gradient NMR in casein suspensions, and in gels induced by acidification, enzyme action and a combination of both. For molecules with $M_w \leq 1020$, the diffusion was only dependent on the casein concentration whatever the molecular weight of the probe or the sample studied. However, for PEG with $M_w \geq 8000$, there was strong dependence of diffusion on PEG size and on the casein network structure as revealed by scanning electron microscopy images. The diffusion coefficients of the two largest PEGs were increased after coagulation by amounts which depended on the internal structure of the gel. In addition, the 527000 g/mol PEG was found to deviate from Gaussian diffusion behavior to greater or lesser extents according to the casein concentration and the sample microstructure. The results are discussed in terms of network rearrangements.

Keywords: Diffusion, NMR, stretching exponent, curved echo decay, PEG, PEO, probe, tracer, casein, micelle, gel, acid, chymosin, rennet, structure.

INTRODUCTION

Caseins are the major proteins of milk and they are directly involved in the formation of dairy gels as they constitute the building blocks of the network. Classical processes involving acid and rennet coagulation or combinations of both are used to convert milk into gels such as yoghurt or cheese curd. Acid gels are obtained through the acidification of the medium, and rennet gels are formed by enzymatic hydrolysis (by chymosin). It is well known that these different types of gel do not have the same rheological and structural properties. For example, rennet gels are more viscous than their acid counterparts, and gels made by the concomitant action of an enzyme and an acid are constituted of thicker aggregates and larger pores². Functional properties such as water holding capacity or permeability are therefore different within rennet and acid gels^{3,4}. However, very little is currently known about the impact of these different types of coagulation on diffusion processes.

In this study, the self-diffusion of probes was investigated in various casein matrices. Diffusion measurements were carried out with the Pulsed Field Gradient NMR (PFG-NMR) technique as this method has proved to be very powerful in applications dealing with progressively more “difficult” samples, including systems that involve compositional complexity or morphological heterogeneity. The probe molecules used are poly(ethylene glycol) (PEG) and poly(ethylene oxide) (PEO) for low and high molecular weights, respectively (both types of polymer will be referred to PEG as they differ by only one chain end). Numerous PFG-NMR studies have been performed on PEG self-diffusion in various matrices such as polymer solutions and gels⁵⁻¹⁸, whey protein systems¹⁹, cartilage²⁰, wet cotton²¹, agarose gels²² and alginate samples^{23,24}. One of the main conclusions arising from these studies is that the sample structure has an influence on PEG diffusion. For a given molecular weight and a given matrix concentration, normalized self-diffusion coefficients can be very different according to the microstructure of the matrix.

Studies have also been carried out on the self-diffusion of water²⁵⁻²⁷ and PEGs¹ in casein suspensions and in rennet gels. According to Mariette *et al.*²⁷, water diffusion in casein systems can be explained by two diffusion pathways, one around and the other through the casein micelles. The obstruction effect on water diffusion was akin to local restrictions at the casein surface and explained the absence of effect of casein gelation by rennet. A more complex behavior was observed for PEG molecules. Firstly, the diffusion coefficients were

dependent on both the casein concentration and the PEG size: the larger the PEG size, the greater the hindrance to diffusion. Secondly, the formation of a rennet gel resulted in an enhanced diffusion coefficient for large probes. As for water, the model with two compartments was used to describe the results in solutions and gels. According to this model, the increase in the diffusion coefficients could be explained by a decrease in the casein hydration and hence by a change in the sample microstructure. However, the model failed to describe the diffusion of the largest PEG studied (634000 g/mol). Moreover, this PEG was the only one where a curvature was observed in the echo decays of the diffusion spectra despite its low polydispersity index. More information is required regarding these phenomena to provide greater understanding of the mechanisms that influence molecular diffusion.

In the present study, changes in the diffusion rate of PEGs within casein suspensions and acid gels of different casein concentrations were compared. PEG self-diffusion measurements are also reported for three different types of casein network formed from concentrated casein solutions. These diffusion findings were compared to SEM images to improve the understanding of the influence of the microstructure on solute diffusion. In addition, we discuss various reasons for the presence of an anomalous diffusion behavior observed for the largest polymer. We demonstrate that all the results presented can be explained qualitatively with a single interpretation based on network rearrangements. This study is an extension of previously published work^{1,19}.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Native phosphocaseinate powder (INRA, Rennes, France) was used (**Table 1**). PEGs with different M_w (620, 1020, 8440, 96750 and 527000) and low polydispersity indices ($M_w/M_n = 1.06, 1.04, 1.05, 1.06$ and 1.06 , respectively) were obtained from Polymer Laboratories (Marseilles, France). Sodium azide (Merck, Darmstadt, Germany), sodium chloride and Glucono-Delta-Lactone (GDL) with a purity above 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were used without purification. D_2O (purity above 99.8%) was purchased from Cortecnet (Paris, France) and the chymosin solution used was the Chymax-Plus (Chr Hansen, Arpajon, France).

	Micellar casein Powder (%)
Total solids (g/kg)	100
Total nitrogen matter (g/kg)	90.7
Non-casein nitrogen (g/kg)	5.7
Non-protein nitrogen (g/kg)	0.6
Calcium (g/kg)	2.9
Ash (g/kg)	8.1
Pure caseins (g/kg)	85.0

Table 1. Composition of micellar casein powder.

Preparation of native phosphocaseinate suspension (NPCS). Rehydration of the powder was performed at room temperature during 36 h with D_2O containing 0.1 M NaCl and 0.2% (w/w) NaN_3 to prevent bacterial growth. Once the powder was totally rehydrated, 0.1% (w/w) of PEG was added to casein suspensions regardless of molecular weights. The pD measured was 6.80 in all samples.

Determination of dry matter. The dry matter of all casein suspensions was verified by measuring variations in weight after drying in an oven for 24 h at 100°C. Concentrations were then calculated from the pure casein percentage (**Table 1**) and ranged from 4.8 to 15.0 g of casein for 100 g D_2O .

Acid gels. According to the casein concentration, defined amounts of GDL were added to solutions to reach a final pD of 4.60 ± 0.05 . After addition of GDL, casein suspensions were

stirred for 5 min and small amounts were transferred to 5 mm NMR tubes (~ 1 mL) that were kept at room temperature for 48 h before analysis. No shrinkage occurred within this interval.

Enzymatic gels. A chymosin dilution (1 mL in 99.0 g of distilled water) was always prepared 20 min before each inoculation. All enzymatic gels had a casein concentration of 15.0 g/100 g D₂O and were induced by addition of 336 µL of the chymosin dilution to 10 g of NPCS. The samples were then stirred for 5 min and small amounts were transferred to 5 mm NMR tubes. NMR tubes were then placed in a water bath for 2 h at 30°C, after which they were cooled to room temperature. Analyses were carried out 24 h after inoculation. No shrinkage occurred within this interval.

Combined gels. The casein concentration used was 15.0 g/100 g D₂O. The same procedure as for enzymatic gels was used to form combined gels, except that 410 mg GDL was added to the 10 g NPCS at the same time as the chymosin. The final pD was 4.60 ± 0.05 in all samples. Combined gels were analyzed 24 h after inoculation. No shrinkage occurred within this interval.

pD measurement. All pD were calculated from the equation: $pD = pH_{nom} + 0.40^{28}$, where pH_{nom} is the nominal reading of our pH-meter (Schott, combination electrode type No N6280, Germany).

Scanning electron microscopy (SEM). Small cubes of the gels ($5 \times 5 \times 5$ mm) were immersed in 2.5% v/v glutaraldehyde at 20°C for 48 h in a sodium cacodylate buffer, pH 7.2. Samples were rinsed several times with distilled water before being dehydrated in a graded ethanol series (10–30–50–70–80–90–95–100% (v/v)) in 20 min steps and finally conserved in acetone (purity above 99.9%) for one night. Samples were then dried using CO₂ in a critical-point drier (CPD 010, Balzers Union Ltd, Liechtenstein). Dried samples were fractured, mounted onto specimen stubs, gold coated and analyzed microscopically using a scanning electron microscope (Jeol JSM 6301F) operated at an acceleration voltage of 9 kV. The images were produced by CMEBA (France, Rennes).

NMR Self-Diffusion Measurements. All measurements were performed at $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ on a 500 MHz Bruker spectrometer equipped with a field gradient probe. The BPP-LED

sequence²⁹⁻³¹ was used with 16 different gradient strengths (g) ranging from ~ 0.25 to 6.00 T/m and a gradient length (δ) equal to 1.0 ms. The diffusion interval (Δ) was adjusted to maintain a constant diffusion distance $z \sim 1.5$ μm , in accordance with the Einstein equation $z = (2.D.\Delta)^{1/2}$. Sixteen scans were carried out and the recycle delay was set at five T_1 .

Theoretical considerations and processing methods. All the data processing was performed with Matlab software and all fits were performed by non-linear least square methods. Monte-Carlo simulations were used for error calculations with 200 iterations. In a PFG-NMR experiment using the BPP-LED sequence, the echo intensity, I , is described by:

$$I / I_0 = \sum_i p_i \exp(-k D_i) \quad (1)$$

with
$$k = \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3 - \tau/2) \quad (2)$$

where I_0 is the signal intensity in the absence of gradients, γ the gyromagnetic ratio (for protons, $\gamma = 26.7520 \times 10^7$ rad.T⁻¹.s⁻¹), g the amplitude of the gradient pulse, δ gradient pulse duration, Δ the time between the leading edges of gradient pulses, τ the time between the end of each gradient and the next radiofrequency pulse, D_i the self-diffusion coefficient of the i th component, p_i the fractional proton number of the i th component, and $\sum p_i = 1$ (in this study, i is one or two).

Eq. 1 was used for HOD (monodeuterated water) and PEGs having molecular weights less than 527000. For the largest PEG, an increasing non-exponential trend was observed as the concentration increased. It was found that a stretched exponential of the following form constituted a very good approximation for the decay function at all concentration:

$$I / I_0 = \exp \left[- (k D_{app})^\beta \right] \quad (3)$$

Here, D_{app} is an apparent diffusion coefficient and β the “stretching exponent”. This approach has been used in a number of previous studies^{24,32-36}. The β parameter describes the width of the distribution of diffusion coefficients. β is equal to one for a monodisperse system and decreases from unity if the width of the diffusion coefficient distribution becomes greater. A mean self-diffusion coefficient D_{mean} can be obtained through the equation:

$$D_{mean} = \frac{D_{app}}{\frac{1}{\beta} \Gamma\left(\frac{1}{\beta}\right)} \quad (4)$$

where Γ is the gamma function.

In NPCS and in enzymatic gels, all diffusion coefficients were obtained by fitting **eq. 1**, with $i = 1$, to the raw NMR data. In an ordinary $^1\text{H-NMR}$ spectrum, the PEG peak overlaps with casein signals at ~ 3.6 ppm. However, due to the very short relaxation times (T_1 , T_2) of casein protons, their signals were severely attenuated in BPP-LED spectra and did not contribute to PEG echo intensity.

In acid and combined gels, water diffusion was obtained as before by **eq. 1**, but in these samples PEGs and gluconic acid, which is formed by hydrolysis of GDL, presented an overlapping signal in the diffusion spectra. For such NMR data, the diffusion coefficients of each component can be calculated by fitting **eq. 1** with $i = 2$. This method was used for the 96750 g/mol and 8440 g/mol PEGs. However, because smaller PEGs (620 and 1020 g/mol) and gluconic acid have very similar diffusion coefficients, the latter method appeared inefficient for separation of each component. For such samples, the diffusion coefficient of gluconic acid was first determined from an isolated and specific peak of the latter. The proportion of the gluconic acid signal overlapping with the PEG signal was then estimated by taking an isolated casein signal as reference. These two values were finally reintroduced in **eq. 1** with $i = 2$ to estimate the diffusion coefficients of the 620 and 1020 g/mol PEGs in acid and combined gels. For the 527000 g/mol PEG, the gluconic acid signal was totally attenuated in the third spectrum of the diffusion spectra. Results for this polymer were thus obtained by fitting **eq. 3** and **eq. 4** to the NMR data, after eliminating the first two intensities. In the rest of this paper, all diffusion data presented for the 527000 g/mol PEG are thus D_{mean} values.

RESULTS

PEG self-diffusion in D₂O. Stejskal-Tanner plots obtained at 20°C for each PEG in a D₂O/NaCl solution (0.1 M) are given in **Figure 1**. Except for the largest PEG, all echo attenuations were linear, indicating that there was no need to account for mass polydispersity effects.

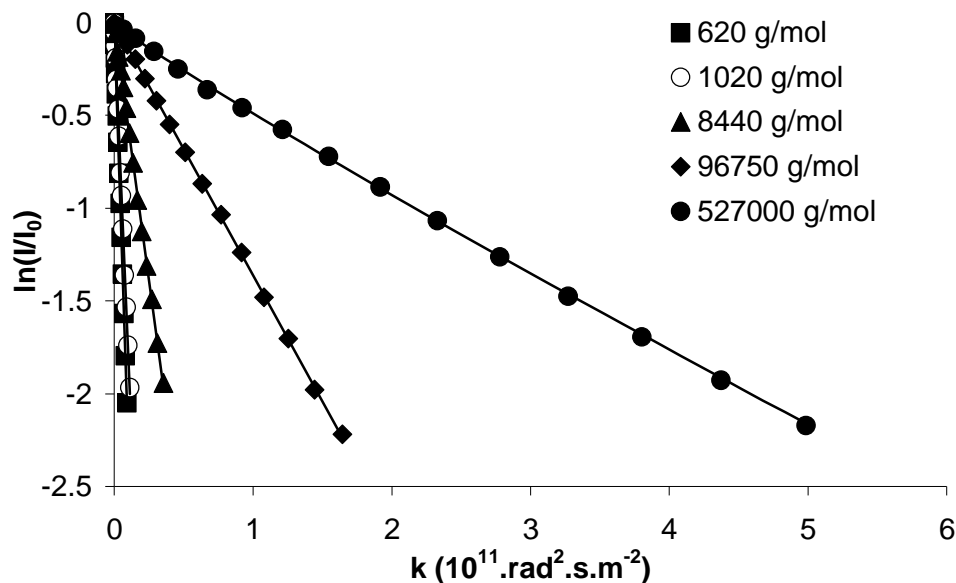


Figure 1. Stejskal-Tanner plots of PEGs in a D₂O/NaCl solution (0.1 M) at 20°C for different PEG molecular weights. Solid lines are linear regressions except for the 527000 g/mol PEG where the line is the fit curve obtained with the stretched exponential approach (eq. 3).

For the 527000 g/mol PEG, as a slight curvature was found, the stretched exponential approach was used to account for the distribution of diffusion coefficients. The β value obtained was 0.92, which indicates the presence of a polydispersity effect for this polymer. The molecular weight, polydispersity index and self-diffusion coefficient measured for all polymers studied are summarized in **Table 2**. All these findings are in accordance with previous studies^{1,5,7}.

M_w	M_w/M_n	D $m^2.s^{-1}$
620	1,06	2.26×10^{-10}
1020	1,04	1.81×10^{-10}
8440	1,05	5.59×10^{-11}
96750	1,06	1.37×10^{-11}
527000	1,06	4.67×10^{-12}

Table 2. Self-diffusion coefficients of the PEGs studied in a $D_2O/NaCl$ solution (0.1 M) at 20°C.

Normalization of diffusion coefficients. The self-diffusion coefficients presented in **Table 2** cannot be directly used to normalize the diffusion coefficients obtained in casein suspensions and gels. Gluconic acid (when present) and soluble residues of the protein powder contribute to molecular diffusion hindrance in the aqueous phase. To consider the effects of casein alone, it is necessary to normalize the self-diffusion coefficient in casein samples (D) by D_0 , the self-diffusion coefficient in the water phase, including these soluble compounds²⁶.

The effects of the soluble powder residues on polymer diffusion were calculated according to the approach described by Colsenet *et al.*¹. This method enabled us to compare diffusion coefficients in solutions and in enzymatic gels, but not those measured in acid or combined gels because the hindrance caused by the addition of GDL must also be considered. Diffusion measurements were thus performed for each PEG in D_2O with different amounts of GDL. The results are illustrated in **Figure 2**. They revealed that the reduction in diffusion was exactly the same whatever the PEG molecular weight. The effect of the addition of GDL was thus explained simply by an increase in bulk viscosity, and a general linear regression was therefore performed on all data. Consequently, in acid and combined gels, once the effect of the powder soluble residues had been taken into account, the self-diffusion coefficients in the aqueous phase (D_0) were predicted from this equation. All the data discussed in this paper are thus reduced self-diffusion coefficients defined as: $D_R = D / D_0$, where D is the self-diffusion coefficient measured in the sample.

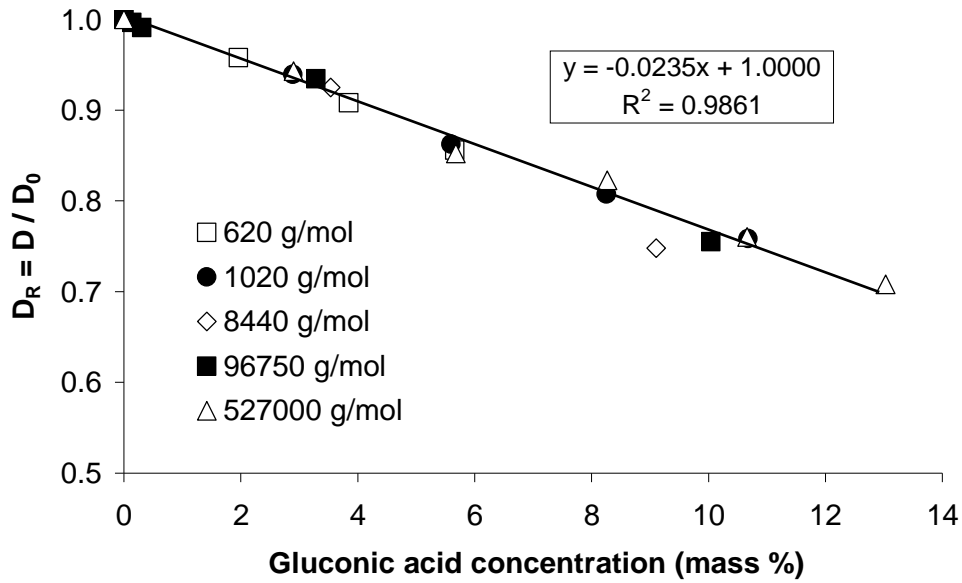


Figure 2. Dry matter effect of gluconic acid on reduced PEG self-diffusion coefficients measured at 20°C. The solid line is the linear regression of the data.

pD effect. Diffusion coefficients of the 96750 g/mol PEG were measured in D₂O for different pD to check for a possible effect of acidity on polymer diffusion. Final pD were obtained by adding a few drops of a HCl/D₂O dilution in 10 g D₂O containing 0.1% (w/w) PEG. As illustrated in **Figure 3**, the results showed that the acidity of D₂O solutions had no effect on PEG diffusion.

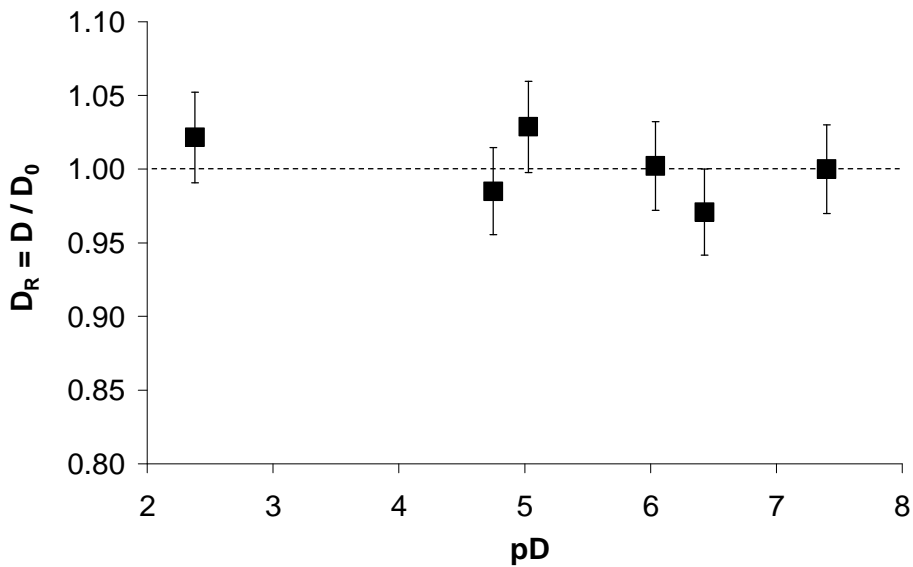


Figure 3. Reduced self-diffusion coefficients of the 96750 g/mol PEG at 20°C at different pD in D₂O solutions. Error bars are 5%.

PEG self-diffusion coefficients in casein suspensions. Self-diffusion coefficients of PEGs in various solutions were measured at 20°C for different casein concentrations. Stejskal-Tanner plots obtained for all PEGs at a high casein concentration are given as an example in **Figure 4**.

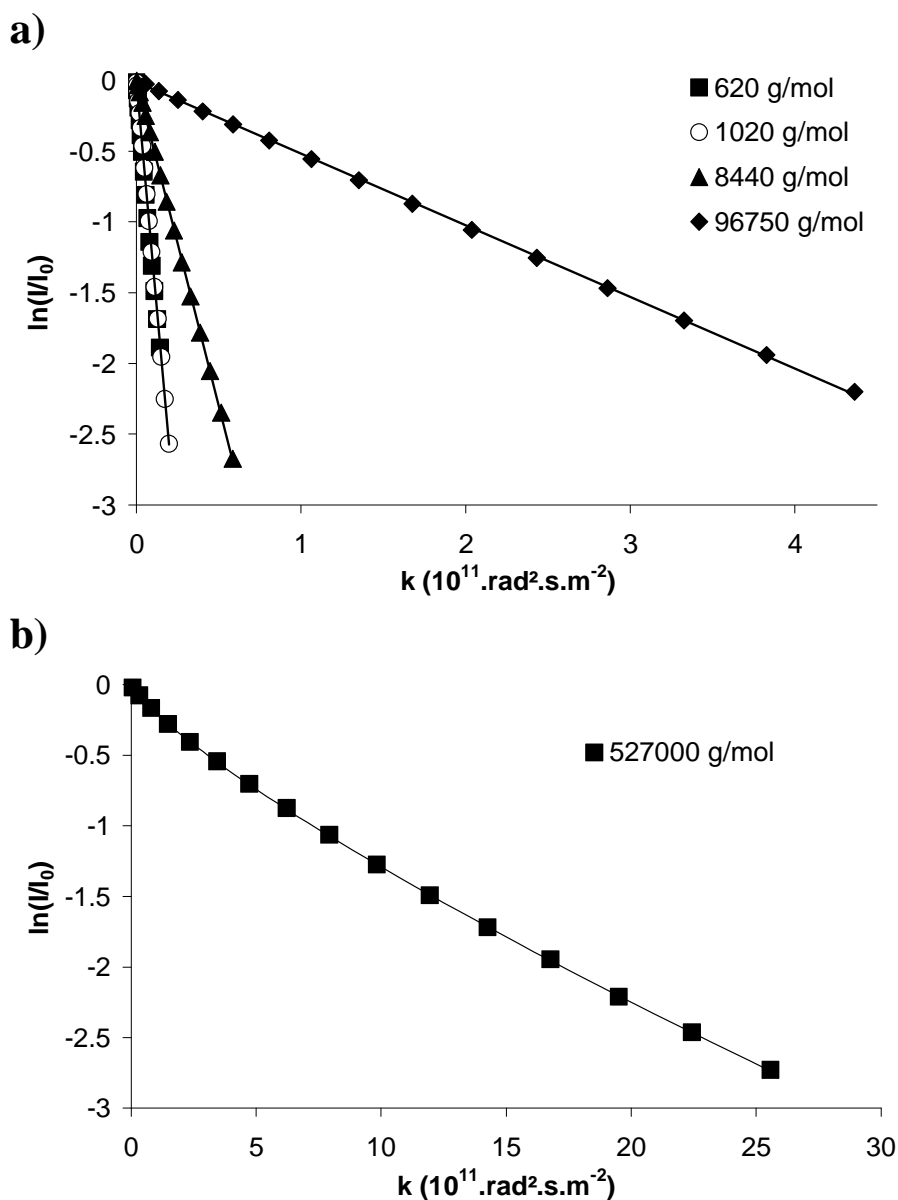


Figure 4. Stejskal-Tanner plots of PEGs in a casein suspension (15 g/100 g D₂O) at 20°C: a) 620, 1020, 8440 and 96750 g/mol PEGs, solid lines are linear regressions; b) 527000 g/mol PEG, the solid line is the fit obtained with the stretched exponential approach (eq. 3).

As observed in D₂O, a linear decrease in the echo intensities was found for all polymers, except for the largest PEG. However, for the latter polymer, the curvature was clearly enhanced in the concentrated casein suspension (**Figure 1** and **Figure 4-b**). To

illustrate this phenomenon, the widths of the diffusion coefficient distributions (β) obtained in NPCS are illustrated in **Figure 5** as a function of casein concentration. The β value remained constant below approximately 9 g /100 g D₂O, but for more concentrated solutions there was an increase in the width of the distribution (β decreased), suggesting a change in the diffusion mechanism above this concentration.

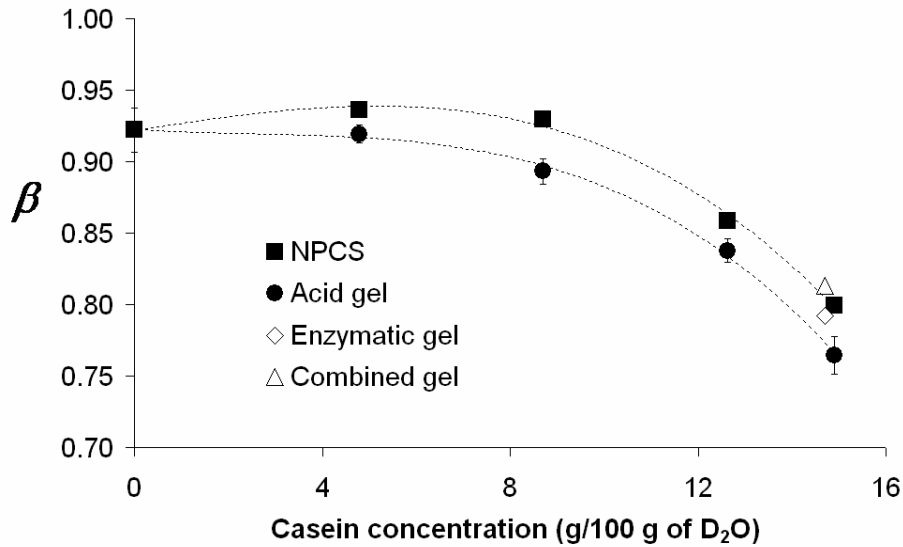


Figure 5. The width of the self-diffusion coefficient distribution of the 527000 g/mol PEG (β) as a function of casein concentration in NPCS and acid gels. The β values obtained in the enzymatic and combined gels are also presented. Dotted lines are guide for the eyes.

Figure 6 illustrates the calculated D_R of water and PEGs plotted as a function of casein concentration in NPCS. D_R decreased when more casein was added for all the systems studied. The diffusion of water and of the two smallest PEGs (620 and 1020 g/mol) was identically hindered in the presence of casein micelles, but for the other polymers the reduction in the diffusion rate was sensitive to PEG size. These results are in complete agreement with the results obtained in casein suspensions by Colsenet *et al.*¹. Nevertheless, we demonstrated that the same hindrance to diffusion occurred below a molecular weight around 1020, suggesting a similar mechanism of obstruction by casein micelles.

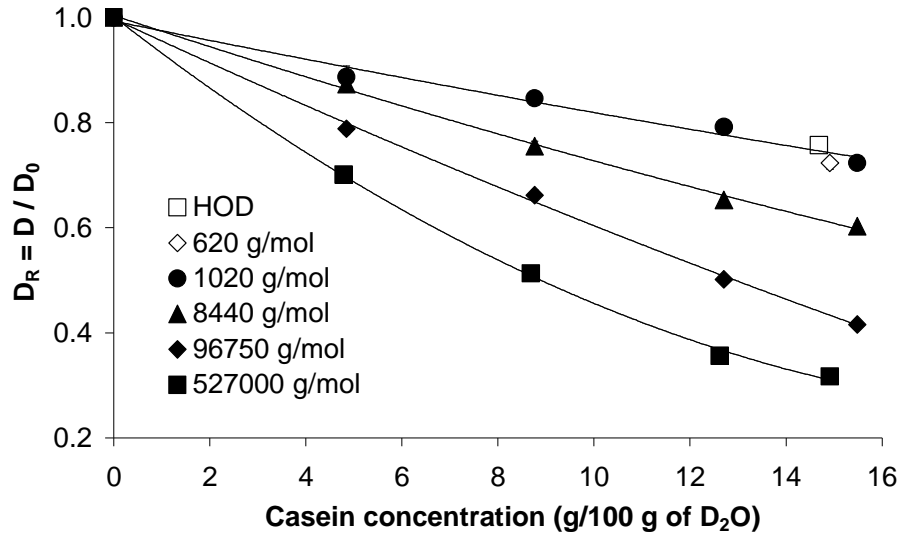


Figure 6. Reduced self-diffusion coefficients of water and the different PEGs as a function of casein concentrations in casein suspensions. Solid lines are guides for the eyes.

Acid gelation effect. Diffusion measurements of the 96750 g/mol PEG in a concentrated acid gel (15.0 g/100 g D₂O) were carried out for different distances probed. The Stejskal-Tanner plots are given in **Figure 7** for Δ values of 14.3, 25, 100, 200 and 1000 ms. The results demonstrated that the PEG self-diffusion coefficient was the same whatever the distance traveled between 0.4 and 3.4 μm . This indicates that no restricted diffusion occurred and that the gel appeared homogenous on the length-scale studied (1.5 μm). However, caution must be applied when trying to extrapolate these findings to the largest polymer because of its anomalous diffusion behavior (**Figure 4-b**).

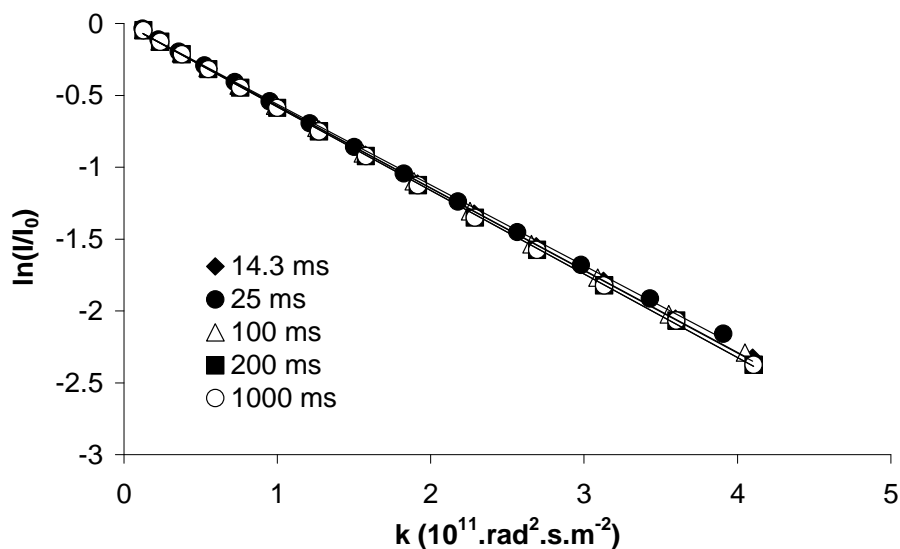


Figure 7. Stejskal-Tanner plots of 96750 g/mol PEG in an acid casein gel (15.0 g/100 g D₂O) for different diffusion intervals Δ at 20°C. Solid lines are linear regressions.

Figure 8 shows the reduced PEG self-diffusion coefficients in acid gels divided by those in solutions, D_R^{gel}/D_R^{sol} , plotted as a function of casein concentration. This ratio is very convenient to visualize the effect of the microstructure alone. D_R^{gel}/D_R^{sol} was equal to one for the three smallest PEGs (620, 1020 and 8440 g/mol) whatever the casein concentration, and hence the acid coagulation had no influence on the diffusion of these polymers. However, for the two largest PEGs (96750 and 527000 g/mol) diffusion was faster in gels than in the liquid state, and this effect increased with both the casein concentration and PEG size. In parallel, the stretched parameter β for the 527000 g/mol PEG was always reduced in the gel system, indicating that the width of the distribution of diffusion coefficients was enlarged (**Figure 5**).

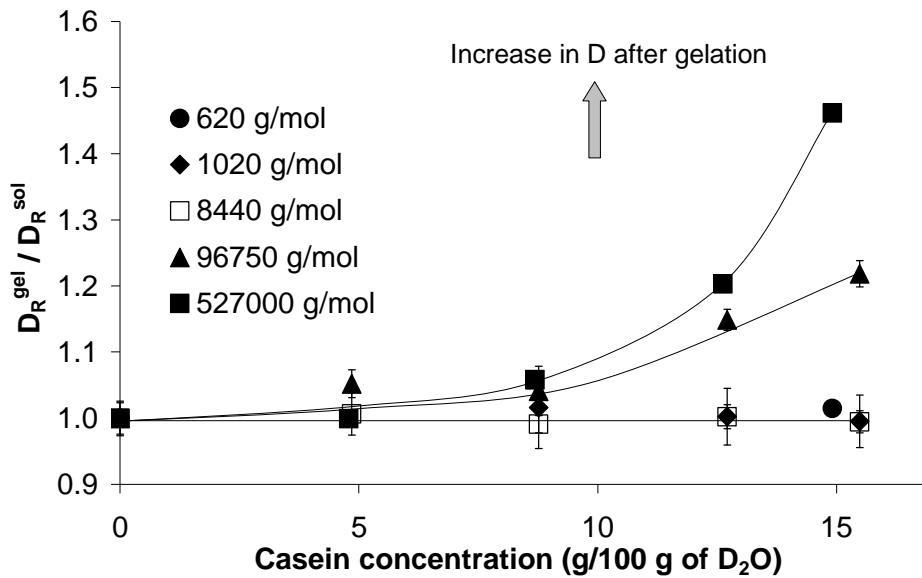


Figure 8. D_R^{gel}/D_R^{sol} ratios obtained for all PEGs as a function of casein concentration for different PEG molecular weights at 20°C. Solid lines are guides for the eyes.

SEM pictures of acid gels at two different concentrations are presented in **Figure 9**. The images show coarse networks constituted of small casein aggregates linked together. The gel structures appeared homogeneous on a scale of few micrometers, which is consistent with the constant value of the diffusion coefficient of the 96750 g/mol PEG obtained for different diffusion intervals Δ (**Figure 7**). As can be seen at higher magnifications (**Figure 9-c** and **9-d**), the gel was formed of aggregated spherical particles with a mean diameter of approximately 150 nm. The same network organization and microstructure were observed for

all concentrations. The decrease in PEG diffusion when the casein concentration increased could therefore be attributed to a simple obstruction effect.

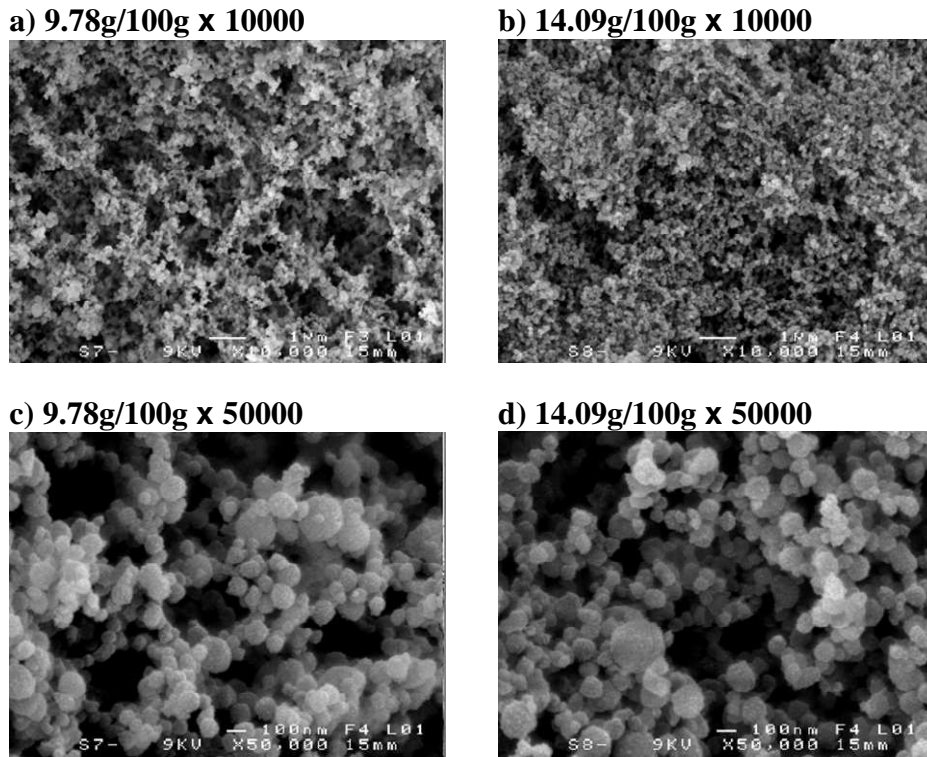


Figure 9. SEM images of acid casein gels at two magnifications and two casein concentrations: 9.78 g/100 g D₂O (a-c) and 14.09 g/100 g D₂O (b-d).

Comparison of effects of enzymatic, acid and combined gelation. The SEM images of the three gels studied (15 g/100 g D₂O) illustrated in **Figure 10** show that all the microstructures appeared homogenous at a scale of several micrometers. As reported above, the acid gel was composed of small spherical particles and pores (**Figure 10-a** and **10-b**). The combined gel presented a different network organisation (**Figure 10-e** and **10-f**). Its microstructure appeared more branched and was formed of highly fused casein aggregates which formed thick strands leaving large pores in between. An intermediate structure was observed in the enzymatic gel (**Figure 10-c** and **10-d**). As in the acid gel, small spherical particles were present but at the same time there were stretched strands and larger pores.

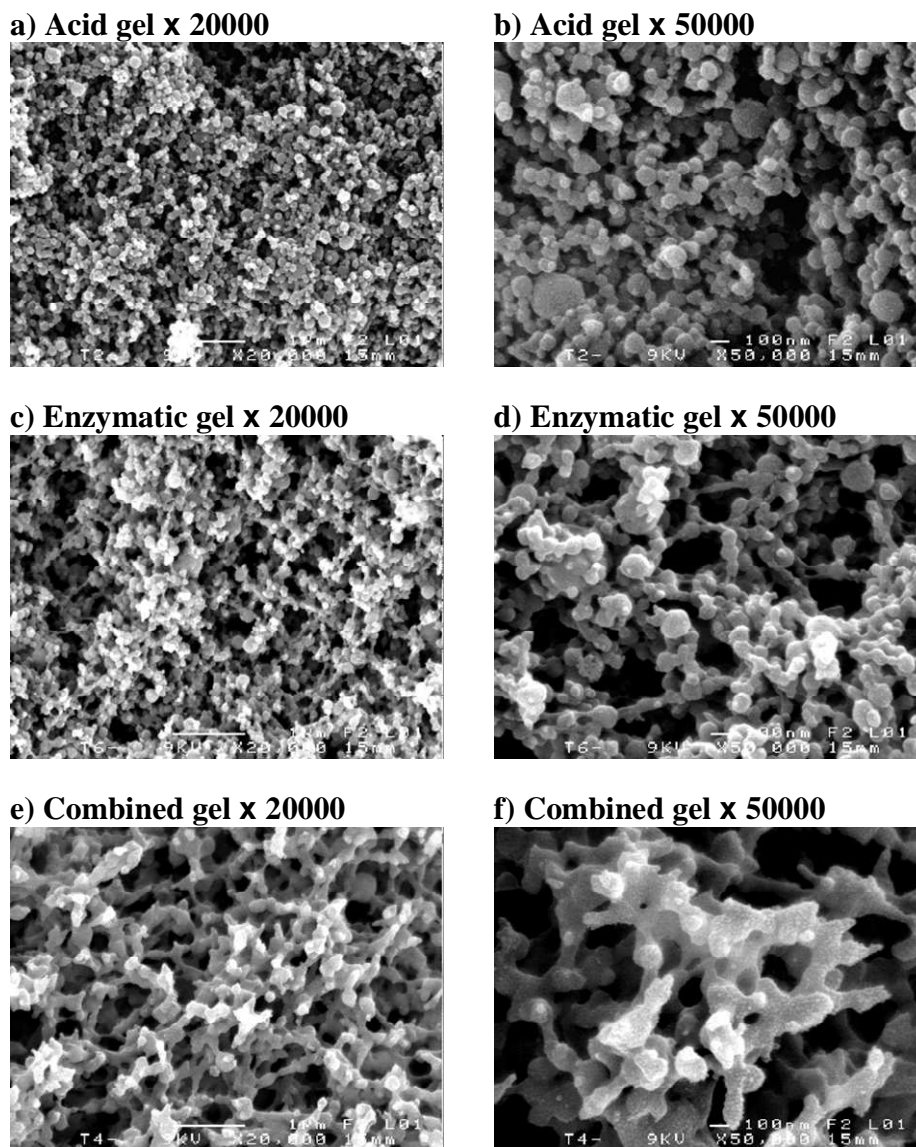


Figure 10. SEM images of an acid gel, a) and b); an enzymatic gel, c) and d); and a combined gel, e) and f), at two magnifications. All gels were formed from the same concentrated casein solution (15.0 g/100 g D₂O).

Self-diffusion coefficients measured in each type of gel are presented in **Figure 11** for all the molecules studied. The $D_R^{\text{gel}}/D_R^{\text{sol}}$ ratio for water and small PEGs (620, 1020 and 8440 g/mol) were always equal to one, but the diffusion was faster in gels for the two largest PEGs. This effect was strongly dependent on gel type as the increase in the diffusion rate of both PEGs was greater in the combined gel, followed by the enzymatic gel and finally the acid gel. In parallel, the β values obtained for the 527000 g/mol PEG in the different gels are illustrated in **Figure 5**. As explained above, reduction of β was observed after acid gelation. This decrease in β was smaller for the enzymatic gel, and for the combined gel a slight increase in β was observed. It thus appeared that the diffusion coefficients and the β values varied in the

gel state, together with the gel microstructures, indicating that all these findings are probably interlinked.

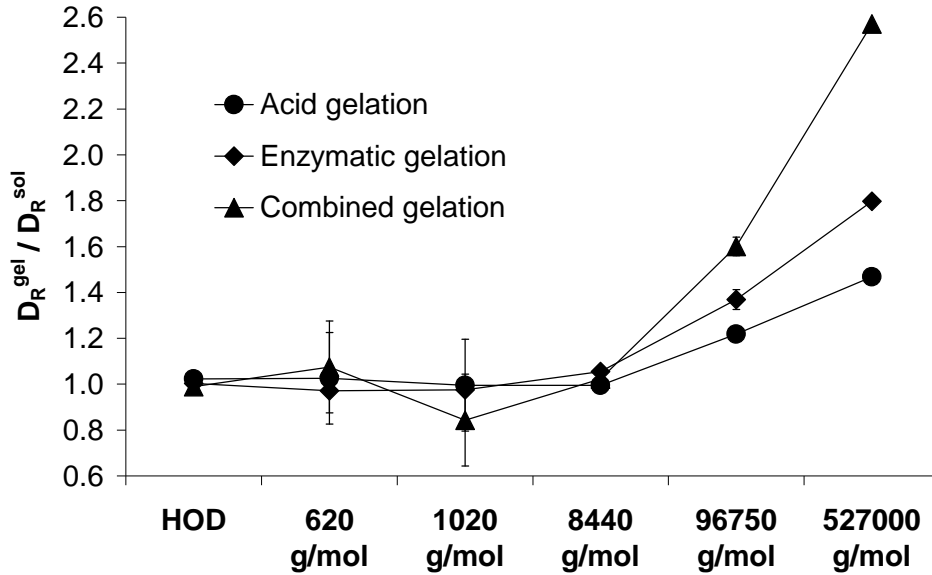


Figure 11. D_R^{gel}/D_R^{sol} ratios obtained at 20°C for HOD and all PEGs in concentrated enzymatic, acid and combined gels (15.0 g/100 g D_2O). Solid lines are guides for the eyes and error bars were arbitrarily set at 20% for the 620 and 1020 g/mol PEGs in acid and combined gels because of the processing method employed.

DISCUSSION

Caseins are present in milk in the form of a suspension of spherical particles called casein micelles. These colloidal particles contain many thousands of individual casein molecules. The overall diameter of micelles ranges from 50 to 500 nm, with a mean diameter around 150 nm³⁷. Numerous models of the internal structure of the casein micelle have been proposed and it now seems that caseins are held together by hydrophobic and electrostatic interactions and that nanoclusters are formed around the colloidal calcium phosphate³⁸⁻⁴¹. All authors agree that micelle stability is provided by a surface layer of κ -casein which confers steric and electrostatic stabilization on the particles^{42,43}. They are known to be very porous, and hydration values reported in the literature are generally around 3 or 4 g of water per 1 g casein⁴⁴⁻⁴⁸.

Casein gels are usually classified as particle gels, although it is now realized that they differ in important aspects from gels formed of hard particles^{41,49}. They are generally subdivided according to the way in which they are formed, i.e. by enzyme action, acidification or a combination of both. Acidification of milk reduces the negative charges of κ -caseins on the micelle surface and result in the coagulation of the system. All the calcium phosphate contained by micelles is progressively dissolved in the aqueous phase and the final gel firmness is low. In comparison, enzymatic gels are formed by addition of an enzyme that hydrolyses the C-terminal part of the κ -caseins, thereby reducing steric and electrostatic stabilization of the casein micelles and causing them to aggregate. The mineral balance between the aqueous and the colloidal phase remains constant and the final gels generally present much greater firmness and often exhibit syneresis.

In all casein gels, structural changes take place during ageing, and are generally explained in terms of rearrangements of the gel network. They constitute an important phenomenon because they cause changes in the gel microstructure and rheological characteristics. For instance, Lucey *et al.*⁵⁰ reported that in acid gels considerable rearrangement of particles in the network is associated with high permeability. In rennet gels, Bauer *et al.*⁵¹ described that “increasingly compact objects” were formed after the aggregation process. Indeed, comparisons between casein gel microstructures and properties are often discussed in terms of variations in the extent of rearrangements^{2-4,52-55}. In a comprehensive

review, Mellema *et al.*⁴⁹ proposed a model based on four structural levels to describe casein particle rearrangements. The phenomena are not fully understood but all authors agree on the fact that they give rise to aggregate fusion, local matrix compaction, and the formation of larger gel pores. It follows that the structural rearrangements that take place after the aggregation stage result in a decrease in the volume occupied by the casein aggregates. As discussed below, our findings are very consistent with this understanding of the formation of dairy gels, and can be broken down according to the size of the diffusing molecule.

Diffusion of molecules with $M_w \leq 1020$. The results presented in **Figure 6** are in very good accord with previous findings¹. Probe diffusion was very sensitive to the casein concentration and PEG size. In addition, we found that the decreases in the diffusion rate of water and small PEGs (620 and 1020 g/mol) followed the same law when the casein concentration increased. These small molecules had therefore a similar sensitivity to the presence of micelles. The simplest explanation is that below a certain molecular weight (between 1000 and 8000), PEGs can enter the same space as water with the same facility, and therefore can diffuse through the micelle structure according to the model proposed by Colsenet *et al.*¹. This conclusion is consistent with previous studies where evidence that large molecules such as β -casein (24000 g/mol)^{56,57} and transglutaminase (45000 g/mol)⁵⁸⁻⁶¹ can enter a casein micelle has been reported. Nevertheless, it is also possible that water and small PEGs follow different pathways but experience a similar obstruction effect.

Despite the different organization of the micelle structure, the diffusion coefficients of molecules with $M_w \leq 1020$ in the gel state were identical after coagulation whatever the gel microstructure (**Figure 11** and **Figure 10**). These findings are consistent with those of Mariette *et al.*²⁷, where water diffusion was reported to be the same in solutions and in the corresponding acid and rennet gels. As we found that small PEGs (620 and 1020 g/mol) and water motion were similarly hindered in solutions by casein micelles, it is not surprising that there was no influence of coagulation on the diffusion of small PEGs. These results demonstrate that modification of the casein network on a microscopic scale has no significant effect on the diffusion of small molecules. For such probes, the main obstruction effect seems therefore to be explained by the proteins themselves and not by the casein aggregate structures.

Diffusion of large molecules. Above 1020 g/mol, the obstruction mechanism was dependent on the PEG size in casein suspensions (**Figure 6**). As proposed by Colsenet *et al.*¹, this can be explained by considering the balance between the diffusion pathways surrounding and going through the casein micelles. According to this interpretation, larger polymers are more constrained inside a micelle and hence experience more obstruction effects when diffusing through it. For a given casein concentration of the suspensions, the decrease in the overall diffusion coefficient of a PEG is thus greater for larger polymer.

The casein micelle structure is modified after coagulation because of the internal rearrangements which result in a matrix structure with more free spaces. According to the SEM images (**Figure 10**) the appearance of the network is highly dependent on the coagulation process. The largest pores were observed for the combined gel and the smallest were obtained for the acid gel, indicating that fewer rearrangements had taken place. These findings are consistent with previous studies in which gels made by a combination of enzyme action and acidification were reported to have large pores, highly fused aggregates, high permeability and unusual rheological properties^{2,3,55,62-64}. According to our NMR data, the increase in the diffusion coefficients after the system coagulation was greater when the casein network appeared more branched, with compact strands and larger pores (**Figure 11** and **Figure 10**). Our results therefore suggest that the diffusion of large PEGs is closely related to the microstructure of the gels, and hence to the extent of the network rearrangements. These structural changes lead to particle fusions and compactions, resulting in greater permeability where more space is available for molecules to diffuse freely.

It is very interesting to see that, despite significant differences in the coagulation processes and in the final properties of the gels studied, as soon as a network is formed a common phenomenon can explain the diffusion data. This reasoning is moreover very comparable to that proposed by Baldursdottir *et al.*²⁴ to explain similar results in alginate matrices. The authors reported enhanced PEG diffusion rates in samples which were irradiated, and according to them the irradiation led to more open networks and thereby facilitated the diffusion of probe molecules. Nevertheless, as illustrated in **Figure 8** for acid gels and previously shown for rennet gels¹, these effects were greater for high casein concentrations. This is understandable because as the casein concentration increases, the casein-free volume decreases in solutions, whereas the empty volume created by the

rearrangements is enhanced. In gels, the proportion of the empty volume that results from the gelation process therefore increases with the casein concentration, and hence the effect of coagulation on PEG diffusion is greater when samples are more concentrated.

Diffusion behavior of the 527000 g/mol PEG. The residues obtained with a bi-exponential fit (data not shown) revealed that it was not possible to account for only two diffusion coefficients. To correctly describe our data, it was necessary to account for a distribution of diffusion coefficients. In general, such a phenomenon can be caused by several mechanisms which arise from the diffusing molecule itself or from the network. Firstly, the mass polydispersity of the 527000 g/mol PEG may play a role. Here the polydispersity index of 1.06 given by the manufacturer is consistent with **Figure 4**, and with the β value of 0.92 found in a 0.1 M NaCl/D₂O solution (**Figure 5**). However, this mass dispersion cannot explain the β values of ~ 0.80 observed, nor its change after coagulation. Other possible explanations for the echo decay observed arise from the presence of heterogeneities inside the matrix³⁴. In our case, the anomalous diffusion behavior of the 527000 g/mol PEG already appeared in solutions (**Figure 5**) where restricted diffusion, anisotropic diffusion or large scale heterogeneities should not exist. Casein suspensions are of course heterogeneous at the level of casein micelles but this scale of heterogeneities seems to be small to explain the curvature observed in the echo decays.

Another important result is that β started to decrease in casein suspensions only above a casein concentration of about 9 g/100 g D₂O (**Figure 5**). It was shown for both casein submicelles^{65,66} and β -casein micelle suspensions⁶⁷ that these spherical particles begin to be close packed at a concentration of approximately 10%. The decrease in the β value observed might therefore be related to a change in the diffusion regime of the PEG due to the crowding of the system. PEG molecules are known to be highly flexible and can adopt a more linear conformation when the hydrodynamic radius is too large to allow the polymer to diffuse without any constraint on its shape^{68,69}. Above 9 g/100 g D₂O, an elongated shape can thus be expected and a reptation regime may be assumed. As a result, the length of the PEG might become non-negligible compared to the distance probed (1.5 μm), and in that case the PFG-NMR measurements will not record the true center-of-mass motion. The self-diffusion coefficient would thus contain contributions from segmental and rotational mechanisms resulting in non-Fickian behavior. Whatever the underlying causes, a classical echo decay

should be recovered when the diffusion interval is sufficiently long, but apparently this delay can sometimes be too long to be observed experimentally by NMR^{24,70}.

In the gel state, according to Van Vliet and Walstra⁷¹ the casein gels are heterogeneous on several length-scales. Firstly, at the scale of the casein particles (as in solutions), heterogeneities are believed to increase in the sense that aggregates are formed and then become more compact with the rearrangements. Secondly, at the level of the casein strands and nodes, and also at the level of “large aggregates” formed by these strands and nodes, new heterogeneities are formed in the gel state. As observed for the acid gel (**Figure 5**), these heterogeneities should result in a wider distribution of the diffusion coefficients. In contrast, the decrease in the volume of the obstructing elements after coagulation is expected to result in a narrower distribution because the proportion of empty space, and hence the proportion of freely diffusing PEG increases. Extensive rearrangements inducing larger pores in the gel microstructure should therefore not only result in an enhanced mean diffusion rate but also in a decrease in the width of the distribution. This is in fact what we observed when comparing the β values obtained in the acid, enzymatic and combined gels (**Figure 5**) with their microstructure (**Figure 10**).

CONCLUSIONS

We have shown that, in contrast to small polymers, the diffusion of large PEGs is very sensitive to the microstructure of casein samples. We have also revealed that deviations from a classical diffusion behavior occurred in concentrated solutions and gels for the 527000 g/mol PEG. The distribution of diffusion coefficients of this large PEG was also found to be affected by the composition and the microstructure of the samples. All these findings could be explained on the basis of network rearrangements that lead to particle fusion and compaction, resulting in a structure where molecules have more free space in which to diffuse. Moreover, depending on the gel formed, the expected extent of structural changes was in very good accordance with the SEM images and literature findings. Probe diffusion has thus proved to be a promising approach to characterize the structural changes occurring after the establishment of a casein network. As the PFG-NMR technique is non-destructive and can be repeated over the course of time, further investigations are in progress to reveal whether diffusion experiments could provide dynamic information on these rearrangements.

Acknowledgements

The authors thank the Regional Council of Brittany and SOREDAB for financial support. We are grateful to Mr. Armel Guillermo and Mr. Arnaud Bondon for their help about NMR experiments and Mr. Joseph Le Lannic for assistance with the SEM experiments. We also thank Mr. Jean-Michel Soulié from SOREDAB for helpful discussions and analyses.

REFERENCES

1. Colsenet, R., O. Soderman, and F. Mariette, *Effect of casein concentration in suspensions and gels on poly(ethylene glycol)s NMR self-diffusion measurements*. *Macromolecules*, **2005**. 38(22): p. 9171-9179.
2. Aichinger, P.A., M. Michel, C. Servais, M.L. Dillmann, M. Rouvet, N. D'Amico, R. Zink, H. Klostermeyer, and D.S. Horne, *Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **2003**. 31: p. 243-255.
3. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid*. *International Dairy Journal*, **2001**. 11: p. 559-565.
4. Mellema, M., J.W.M. Heesakkers, J.H.J. Van Opheusden, and T. Van Vliet, *Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry*. *Langmuir*, **2000**. 16(17): p. 6847-6854.
5. Johansson, L., U. Shantze, and J.E. Lofroth, *Diffusion and interaction in gels and solutions. 2. Experimental results on the obstruction effect*. *Macromolecules*, **1991**. 24(22): p. 6019-6023.
6. Brown, W. and P. Stilbs, *Self-diffusion of poly(ethylene oxide) in aqueous dextran solutions measured using FT-pulsed field gradient NMR*. *Polymer*, **1982**. 24: p. 188-192.
7. Masaro, L., X.X. Zhu, and P.M. MacDonald, *Study of the self-diffusion of poly(ethylene glycol)s in poly(vinyl alcohol) aqueous systems*. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, **1999**. 37(17): p. 2396-2403.
8. Masaro, L., X.X. Zhu, and P.M. Macdonald, *Self-diffusion of oligo- and poly(ethylene glycol)s in poly(vinyl alcohol) aqueous solutions as studied by pulsed-gradient NMR spectroscopy*. *Macromolecules*, **1998**. 31(12): p. 3880-3885.
9. Nyden, M., O. Soderman, and G. Karlstrom, *A PFG NMR self-diffusion investigation of probe diffusion in an ethyl(hydroxyethyl)cellulose matrix*. *Macromolecules*, **1999**. 32(1): p. 127-135.

10. Walderhaug, H. and B. Nystrom, *A pulsed field gradient NMR study of poly(oxyethylene) diffusion in aqueous solutions and gels of ethyl(hydroxyethyl) cellulose-sodium dodecyl sulphate systems*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **1999**. 149: p. 379-387.
11. Jo, B.W., M. Hess, and M. Zahres, *Self-diffusion of poly(ethylene oxide) - modified paclitaxel in dilute aqueous solutions*. Materials Research Innovations, **2003**. 7(3): p. 178-182.
12. Petit, J.M., X.X. Zhu, and P.M. Macdonald, *Solute probe diffusion in aqueous solutions of poly(vinyl alcohol) as studied by pulsed-gradient spin-echo NMR spectroscopy*. Macromolecules, **1996**. 29(1): p. 70-76.
13. Griffiths, P.C., P. Stilbs, G.E. Yu, and C. Booth, *Role of molecular architecture in polymer diffusion - a PGSE-NMR study of linear and cyclic poly(ethylene oxide)*. Journal of Physical Chemistry, **1995**. 99(45): p. 16752-16756.
14. Hakansson, B., M. Nyden, and O. Söderman, *The influence of polymer molecular-weight distributions on pulsed field gradient nuclear magnetic resonance self-diffusion experiments*. Colloid and Polymer Science, **2000**. 278(5): p. 399-405.
15. Masaro, L., M. Ousalem, W.E. Baille, D. Lessard, and X.X. Zhu, *Self-diffusion studies of water and poly(ethylene glycol) in solutions and gels of selected hydrophilic polymers*. Macromolecules, **1999**. 32(13): p. 4375-4382.
16. Matsukawa, S. and I. Ando, *A study of self-diffusion of molecules in polymer gel by pulsed-gradient spin-echo ^1H NMR*. Macromolecules, **1996**. 29: p. 7136-7140.
17. Matsukawa, S. and I. Ando, *Study of self-diffusion of molecules in a polymer gel by pulsed-gradient spin-echo ^1H -NMR. 2 : Intermolecular hydrogen-bond interaction between the probe polymer and network polymer in N,N-dimethylacrylamide-acrylic acid copolymers gel systems*. Macromolecules, **1997**. 30(26): p. 8310-8313.
18. Kwak, S. and M. Lafleur, *Self-diffusion of macromolecules and macroassemblies in curdlan gels as examined by PFG-SE NMR technique*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2003**. 221: p. 231-242.
19. Colsenet, R., O. Soderman, and F. Mariette, *Effects of ionic strength and denaturation time on polyethyleneglycol self-diffusion in whey protein solutions and gels visualized*

- by nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(14): p. 5105-5112.
20. Trampel, R., J. Schiller, L. Naji, F. Stallmach, J. Kärger, and K. Arnold, *Self-diffusion of polymers in cartilage as studied by pulsed field gradient NMR*. *Biophysical Chemistry*, **2002**. 97: p. 251-260.
21. Newling, B., *Pulsed field gradient NMR study of the diffusion of H₂O and polyethylene glycol polymers in the supramolecular structure of wet cotton*. *Journal of Physical Chemistry B*, **2003**. 107: p. 12391-12397.
22. Weng, L.H., S.M. Liang, L. Zhang, X.M. Zhang, and J. Xu, *Transport of glucose and poly(ethylene glycol)s in agarose gels studied by the refractive index method*. *Macromolecules*, **2005**. 38(12): p. 5236-5242.
23. Favre, E., M. Leonard, A. Laurent, and E. Dellacherie, *Diffusion of polyethyleneglycols in calcium alginate hydrogels*. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, **2001**. 194: p. 197-206.
24. Baldursdottir, S.G., A.-L. Kjoniksen, and B. Nystrom, *The effect of riboflavin-photoinduced degradation of alginate matrices on the diffusion of poly(oxyethylene) probes in the polymer network*. *European Polymer Journal*, **2006**. 42(11): p. 3050-3058.
25. Métais, A., M. Cambert, A. Riaublanc, and F. Mariette, *Influence of fat globule membrane composition on water holding capacity and water mobility in casein rennet gel: A nuclear magnetic resonance self-diffusion and relaxation study*. *International Dairy Journal*, **2006**. 16(4): p. 344-353.
26. Métais, A., M. Cambert, A. Riaublanc, and F. Mariette, *Effects of casein and fat content on water self-diffusion coefficients in casein systems: a pulsed field gradient nuclear magnetic resonance study*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**. 52(12): p. 3988-3995.
27. Mariette, F., D. Topgaard, B. Jönsson, and O. Söderman, *¹H NMR diffusometry study of water in casein dispersion and gels*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50(15): p. 4295-4302.
28. Glasoe, P.K. and F.A. Long, *Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide*. *Journal of Physical Chemistry*, **1960**. 64(1): p. 188-190.

29. Wu, D.H., A.D. Chen, and C.S. Johnson, *An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses*. Journal of Magnetic Resonance Series A, **1995**. 115(2): p. 260-264.
30. Gibbs, S.J., *Observations of diffusive diffraction in a cylindrical pore by PFG NMR*. Journal of Magnetic Resonance, **1997**. 124(1): p. 223-226.
31. Johnson, C.S., *Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: Principles and applications*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, **1999**. 34: p. 203-256.
32. Nyström, B., H. Walderhaug, and F.K. Hansen, *Dynamic crossover effects observed in solutions of a hydrophobically associating water-soluble polymer*. Journal of Physical Chemistry, **1993**. 97(29): p. 7743-7752.
33. Abrahmsen-Alami, S. and P. Stilbs, *H^1 -NMR self-diffusion and multifold H^2 spin relaxation study of model associative polymer and sodium dodecyl-sulfate aggregation in aqueous solution*. Journal of Physical Chemistry, **1994**. 98(25): p. 6359-6367.
34. Nyden, M. and O. Soderman, *An NMR self-diffusion investigation of aggregation phenomena in solutions of ethyl(hydroxyethyl)cellulose*. Macromolecules, **1998**. 31(15): p. 4990-5002.
35. Walderhaug, H. and B. Nyström, *Anomalous diffusion in an aqueous system of a poly(ethylene oxide) - poly(propylene oxide) triblock copolymer during gelation studied by pulsed field gradient NMR*. Journal of Physical Chemistry, **1997**. 101: p. 1524-1528.
36. Shapiro, Y.E., *Compartmentation in the poly(vinyl alcohol) cryogels. H^1 NMR self-diffusion study*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2000**. 164(1): p. 71-83.
37. McMahon, D.J. and R.J. Brown, *Composition, structure, and integrity of casein micelles: A review*. Journal of Dairy Science, **1984**. 67: p. 499-512.
38. Horne, D.S., *Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products*. International Dairy Journal, **1998**. 8(3): p. 171-177.
39. Marchin, S., J.L. Putaux, F. Pignon, and J. Leonil, *Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and*

- small-angle x-ray scattering/ultrasmall-angle x-ray scattering*. Journal of Chemical Physics, **2007**. 126 (4): Art. No. 045101.
40. Lucey, J.A., *Formation and physical properties of milk protein gels*. Journal of Dairy Science, **2002**. 85(2): p. 281-294.
41. Horne, D.S., *Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2003**. 213: p. 255-263.
42. Walstra, P., *On the stability of casein micelles*. Journal of Dairy Science, **1990**. 73: p. 1968-1979.
43. Holt, C. and D.S. Horne, *The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1996**. 50(2): p. 85-111.
44. Kumosinski, T.F., H. Pessen, H.M. Farrell, Jr., and H. Brumberger, *Determination of the quaternary structural states of bovine casein by small-angle X-Ray scattering: submicellar and micellar forms*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **1988**. 266: p. 548-561.
45. Guillaume, C., L. Jimenez, J.L. Cuq, and S. Marchesseau, *An original pH-reversible treatment of milk to improve rennet gelation*. International Dairy Journal, **2004**. 14(4): p. 305-311.
46. Gastaldi, E., A. Lagaude, S. Marchesseau, and B.T. DelaFuente, *Acid milk gel formation as affected by total solids content*. Journal of Food Science, **1997**. 62(4): p. 671-675.
47. Vetier, N., S. Banon, J.P. Ramet, and J. Hardy, *Casein micelle solvation and fractal structure of milk aggregates and gels*. Lait, **2000**. 80(2): p. 237-246.
48. Karlsson, A.O., R. Ipsen, K. Schrader, and Y. Ardo, *Relationship between physical properties of casein micelles and rheology of skim milk concentrate*. Journal of Dairy Science, **2005**. 88(11): p. 3784-3797.
49. Mellema, M., P. Walstra, J.H.J. Van Opheusden, and T. Van Vliet, *Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels*. Advances in Colloid and Interface Science, **2002**. 98(1): p. 25-50.

50. Lucey, J.A., T. van Vliet, K. Grolle, T. Geurts, and P. Walstra, *Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties*. International Dairy Journal, **1997**. 7: p. 389-397.
51. Bauer, R., M. Hansen, S. Hansen, L. Ogendal, S. Lomholt, K. Qvist, and D. Horne, *The structure of casein aggregates during renneting studied by indirect fourier transformation and inverse laplace transformation of static and dynamic light-scattering data, respectively*. Journal of Chemical Physics, **1995**. 103(7): p. 2725-2737.
52. Lagoueyte, N., J. Lablee, A. Lagaude, and B.T. De la Fuente, *Temperature affects microstructure of renneted milk gel*. Journal of Food Science, **1994**. 59(5): p. 956-959.
53. Lucey, J.A., T. van Vliet, K. Grolle, T. Geurts, and P. Walstra, *Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 1. Rheological properties*. International Dairy Journal, **1997**. 7: p. 381-388.
54. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone*. Food Research International, **1998**. 31(2): p. 147-155.
55. Van Vliet, T., C.M.M. Lakemond, and R.W. Visschers, *Rheology and structure of milk protein gels*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2004**. 9(5): p. 298-304.
56. Creamer, K., G.P. Berry, and O.E. Mills, *A study of the dissociation of beta-casein of the bovin casein micelle at low temperature*. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, **1997**. 12: p. 58.
57. Dalgeish, D.G. and J.R. Law, *pH-induced dissociation of bovine casein micelles. 2. mineral solubilization and its relation to casein release*. Journal of Dairy Research, **1989**. 56: p. 727-735.
58. De Kruif, C.G., R. Tuinier, C. Holt, P.A. Timmins, and H.S. Rollema, *Physicochemical study of kappa- and beta-casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase*. Langmuir, **2002**. 18(12): p. 4885-4891.

59. O'Connell, J.E. and C.G. De Kruif, *Beta-casein micelles; cross-linking with transglutaminase*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2003**. 216: p. 75-81.
60. Schorsch, C., H. Carrie, A.H. Clark, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 519-528.
61. Schorsch, C., H. Carrie, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 529-539.
62. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono-delta-lactone*. Journal of Dairy Research, **2000**. 67(3): p. 415-427.
63. Tranchant, C.C., D.G. Dalgleish, and A.R. Hill, *Different coagulation behaviour of bacteriologically acidified and renneted milk: the importance of fine-tuning acid production and rennet action*. International Dairy Journal, **2001**. 11: p. 483-494.
64. Lopez, M.B., S.B. Lomholt, and K.B. Qvist, *Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effect of pH and enzyme concentration*. International Dairy Journal, **1998**. 8(4): p. 289-293.
65. Farrer, D. and A. Lips, *On the self-assembly of sodium caseinate*. International Dairy Journal, **1999**. 9: p. 281-286.
66. Panouille, M., L. Benyahia, D. Durand, and T. Nicolai, *Dynamic mechanical properties of suspensions of micellar casein particles*. Journal of Colloid and Interface Science, **2005**. 287(2): p. 468-475.
67. Panouille, M., D. Durand, and T. Nicolai, *Jamming and gelation of dense beta-casein micelle suspensions*. Biomacromolecules, **2005**. 6(6): p. 3107-3111.
68. De Gennes, P.G., *Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles*. Journal of Chemical Physics, **1971**. 55(2): p. 572 -579.
69. De Gennes, P.G., *Brownian motions of flexible polymer chains*. Nature, **1979**. 282: p. 367-370.

70. Rosen, O., M. Bostrom, M. Nyden, and L. Piculell, *Anomalous surfactant diffusion in a gel of chemically cross-linked ethyl(hydroxyethyl) cellulose*. *Journal of Physical Chemistry B*, **2003**. 107(17): p. 4074-4079.
71. Van Vliet, T. and P. Walstra, *Water in casein gels - How to get it out or keep it in*. *Journal of Food Engineering*, **1994**. 22: p. 75-88.

Chapitre IV

Publication n°2 :

Evolution de la diffusion
de molécules-sonde
au cours d'une
coagulation présure

La technique de PFG-RMN procure un nouvel outil pour étudier de façon continue l'évolution de la microstructure des gels après l'action de la présure

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication acceptée à paraître dans *Macromolecules*.

Dans cet article, la diffusion d'un PEG de 620 g/mol et d'un PEG de 96750 g/mol a été mesurée en continu par RMN au cours d'une coagulation présure. Le protocole de coagulation utilisé a été délibérément ralenti pour acquérir un maximum de données de diffusion tout au long de la cinétique. De plus, les coefficients de diffusion ont été mesurés à l'aide d'une séquence qui intègre un motif WATERGATE afin de s'affranchir du D₂O.

L'objectif de cette étude est de déterminer quelles sont les influences de chacune des étapes de la coagulation présure sur la diffusion des PEGs, ceci dans le but de préciser les mécanismes qui affectent la diffusion moléculaire. Parallèlement aux mesures de diffusion, des expériences de rhéométrie ont été réalisées pour suivre l'évolution des propriétés physiques de la matrice au cours de la coagulation, dont notamment la transition sol-gel. De plus, des images de MEB et des mesures de rigidité ont été effectuées, à différents temps après l'étape de gélification, afin de caractériser les processus de réarrangement du gel.

La diffusion des sondes n'était pas sensible à l'action de la chymosine ni à la transition sol-gel. Seuls les processus de réarrangement avaient un effet. Ainsi, le coefficient de diffusion du PEG de 96750 g/mol augmentait régulièrement au cours du vieillissement du gel. Cette augmentation a été reliée à la contraction du réseau. Ces résultats démontrent donc que l'accroissement de la porosité du gel peut être suivie en mesurant la diffusion de sondes par RMN. De plus, il est apparu que la diffusion du PEG de 620 g/mol était aussi affectée, bien que faiblement, par ces phénomènes. En revanche, sa diffusion était progressivement ralentie. Celle-ci semble donc être plus sensible à la structure interne du réseau (qui se contracte) qu'à l'augmentation de la porosité du gel.

PFG-NMR techniques provide a new tool for continuous investigation of the evolution of the casein gel microstructure after renneting

*Steven Le Feunteun, François Mariette **

Cemagref, Process Engineering Technology Research Unit, CS 64426, 17 avenue de Cucillé,
35044 Rennes, Cedex, France

* Corresponding author:

François Mariette

Tel: 33 (0)223482121

Fax: 33(0)223482115

E-mail address: Francois.Mariette@cemagref.fr

ABSTRACT

The self-diffusion of water and a small and a large poly(ethylene glycol) (PEG) were monitored during the sol-gel transition of a casein system induced by chymosin action using pulsed field gradient (PFG)-NMR techniques throughout the coagulation process. Rheological measurements revealed that the diffusion rate of the molecules studied was unaffected by the establishment of a network. However, different evolutions occurred during the gel ageing phase, depending on the size of the diffusing molecule. The diffusion coefficient of water remained constant whereas the diffusivity of the small PEG decreased and that of the large PEG increased. Scanning electron microscopy images showed that all these findings could be explained by the progressive compaction of the casein network caused by the occurrence of structural rearrangements. This study demonstrates the sensitivity of probe diffusion to structural changes in casein gels, and also the potential of PFG-NMR techniques to reveal dynamic information on evolving systems at different length scales.

Keywords: Diffusion, NMR, PFG, PEG, probe, tracer, casein micelle, hydration, voluminosity, rearrangements, gel, porosity, chymosin, rennet.

INTRODUCTION

Casein is the main milk protein component. It exists in milk as a suspension of large spherical particles called casein micelles. These colloidal particles can be destabilized in different ways, but in the manufacture of most cheese varieties, the critical first step is the gelation of milk by addition of rennet. The main active component in rennet, chymosin, causes the casein particles to aggregate and form a gel by an enzymatic reaction. Once a three-dimensional casein network is formed, it progressively undergoes structural modifications such as fusion and compaction of the casein particles which can lead to micro- and macrosyneresis, i.e. whey separation¹.

Various parameters such as chymosin and casein concentrations, pH and temperature directly influenced the dynamics of the coagulation process²⁻¹⁰. Depending on these conditions, the gel microstructure and its rheological properties, which are very important attributes of the product, can therefore be very different. The extent of the structural rearrangements that occur during the ageing of the fresh gel seems to be of primary importance^{1,6}, but although it is possible to highlight their effects, no ideal technique exists to investigate their dynamics.

Probe diffusion studies have proved to be very sensitive to changes in the microstructure of a great number of synthetic polymer matrices¹¹⁻²², but also to the coagulation of alginate solutions^{23,24} and of sugar-based samples^{11,25,26}, and of milk protein systems such as β -lactoglobulin²⁷, whey protein^{28,29} and casein micelle³⁰ solutions. In casein matrices, the diffusion rates of large poly(ethylene glycol) (PEG) probes are enhanced after coagulation³⁰ and we demonstrated in a recent study that the size of these increases depends on the final gel microstructure³¹. This could be explained by considering that the diffusion of large probes is very sensitive to the extent of the casein aggregate compaction and thus to the extent of certain rearrangement processes. However, as in all the studies quoted above, the diffusion of a molecule was measured at equilibrium, before and after the perturbation of the system. This method cannot provide any dynamic information on the evolution of the sample microstructure although the modifications of the matrix in reaction to the perturbation can be very progressive. This is precisely the case when casein suspensions are coagulated by addition of chymosin and/or acidifying agent.

In the present study, we designed an original method to investigate how and when probe diffusion rates vary during the coagulation induced by chymosin action. Self-diffusion measurements were repeated throughout the coagulation process by means of pulsed field gradient (PFG)-NMR techniques. This was possible because NMR techniques are non-invasive (i.e. a sample can be analyzed an unlimited number of times) and because a diffusion coefficient can be obtained in a few minutes. This method enabled us to reveal dynamic information on the sample microstructure modifications during sol-gel transition. This study therefore constitutes a new illustration of the potential of probe diffusion measurements to reveal structural changes in complex and evolving matrices. In addition, a WATERGATE scheme was used to suppress the water signal when studying the diffusion of probes. All casein samples were therefore prepared without resorting to the use of heavy water, thus permitting work on realistic products.

The diffusion coefficients of water and a small and a large PEG were followed during the course of the coagulation according to this procedure. The evolution of probe diffusion rates was related to dynamic rheological data and stiffness measurements to characterize the key steps of gel formation. In addition, scanning electron microscopy (SEM) images taken at different times after addition of the enzyme illustrated the changes in gel microstructure during ageing. We showed that different evolutions in the diffusion rates of the molecules studied could be explained with a single interpretation based on compaction of the casein network. The results also demonstrate that probe diffusion measurements during coagulation of a casein sample can contribute to better rationalization of dairy processes.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Native phosphocaseinate powder (INRA, Rennes, France) was used. The powder composition is summarized in **Table 1**. The PEG polymers were obtained from Polymer Laboratories (Marseille, France), with average molecular masses of 620 and 96750 g/mol. Both polymers had the same low polydispersity index of 1.06 as indicated by the suppliers. All polymers, sodium azide (NaN₃) (Merck, Darmstadt, Germany) and sodium chloride (NaCl) were used without further purification. The chymosin solution used was Chymax-Plus purchased from Chr-Hansen (Arpajon, France).

	Micellar casein Powder (%)
Total solids (g/kg)	100
Total nitrogen matter (g/kg)	90.7
Non-casein nitrogen (g/kg)	5.7
Non-protein nitrogen (g/kg)	0.6
Calcium (g/kg)	2.9
Ash (g/kg)	8.1
Pure caseins (g/kg)	85.0

Table 1. Composition of micellar casein powder.

Preparation of native phosphocaseinate suspension (NPCS). The aqueous phase used for the reconstitution consisted of H₂O, with 0.1 M NaCl and 0.2% (w/w) NaN₃ to prevent bacterial growth. Native phosphocaseinate powder (21.0% w/w) was added to the aqueous phase and the solution was vigorously stirred at room temperature for 36 hours to ensure total rehydration of the powder. After this period, 0.1% (w/w) of PEG was added to casein suspensions for the NMR experiments, regardless of molecular weights. The dry matter of all casein suspensions was controlled by measuring variations in weight after drying in an oven for 24 hours at 100°C. Casein concentrations were calculated from values of dry matter in each casein suspension and the pure casein percentage of the dry matter (85.0%, see **Table 1**). The casein suspension concentrations in all samples were 16.75 ± 0.35 g of casein for 100 g of H₂O, and the pH was 6.80 (Schott, pH combination electrode type No N6280, Germany).

Enzymatic coagulation. A chymosin dilution (1 mL in 99.0 g of distilled water) was always prepared and stored at 4°C approximately 20 min before each inoculation to allow more accurate dosage. To start the coagulation process, the chymosin dilution was added to the casein suspension at the proportion of 700 μ L for 100g of NPCS. A chronometer was started at the same time ($t = 0$ s) and the solution was vigorously stirred for 3 min. Samples were then rapidly prepared for NMR and dynamic rheological measurements, whereas for SEM and Puncture experiments samples were stored at 20°C before analysis. No shrinkage of the gel was observed during the time scale of the experiments.

Dynamic rheological measurements. The viscoelastic properties of the enzymatic gel were studied with a controlled stress rheometer (Rheostress RS150, Haake, Germany) using a double gap cylinder sensor (DG41). The temperature was maintained at 20°C and the surface of the sample was covered with silicone oil to prevent evaporation. The storage modulus (G'), loss modulus (G'') and phase angle ($\delta = \tan^{-1}(G''/G')$) were recorded at a frequency of 1 Hz and the rheometer was programmed to adjust the stress automatically to provide a strain of 0.5%, which was found to be within the linear viscoelastic region of the sample.

Puncture tests. The penetration measurements were performed with an Instron Universal Testing Machine 5500 (Instron Ltd., France) monitored by the Merlin software. A flat end puncture probe with a diameter of 12.5 mm was pushed into the sample at a speed of 100 mm/min. The depth of penetration into the sample was 8 mm and the data sampling rate was 50 points per second. The stiffness (slope of the linear part of the curve, representing the elastic deformation, N/mm) and the hardness (strength at the ultimate depth, N) or the strength at fracture (N) when it occurred, were calculated.

Scanning electron microscopy (SEM). At different times after the addition of chymosin, small cubes (5 \times 5 \times 5 mm) were cut out from the gels and immersed for 48 h at 20°C in a sodium cacodylate buffer, pH 7.2, with 2.5% (v/v) glutaraldehyde. Samples were rinsed several times with distilled water before being dehydrated in a graded ethanol series (10 – 30 – 50 – 70 – 80 – 90 – 95 – 100% (v/v)) in 20 minute steps and finally conserved in acetone (purity above 99.9%). Samples were then critical-point dried through CO₂ in a critical-point drier (CPD 010, Balzers Union Ltd, Liechtenstein). Dried samples were fractured, mounted onto specimen stubs, gold coated and analyzed microscopically using a scanning electron

microscope (Jeol JSM 6301F) operated at an acceleration voltage of 9 kV. The images were produced by CMEBA (France, Rennes).

Self-Diffusion Measurements. All the measurements were performed at $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$. To obtain a series of diffusion coefficients during the coagulation process, the self-diffusion of the molecule studied was first measured in the casein suspension. After the addition of chymosin, the sample was rapidly prepared and placed in the spectrometer, and the diffusion experiment was performed again without any changes in the sequence parameters and allowed to repeat over the course of time.

Water self-diffusion was measured on a 20 MHz Bruker spectrometer equipped with a field gradient probe with a spin echo sequence (PFG-SE). The NMR tubes had an internal diameter of 8 mm, and calibration of the strength of gradients was performed with a sample of pure water of a known self-diffusion coefficient at 20°C ($D_{\text{H}_2\text{O}} = 1.98 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Ten values of the gradient strength (g) ranging between 0.6 and 3.2 T/m were used during each measurement. Four scans were carried out and the recycle delay was set at five T_1 . The gradient length (δ) and the diffusion interval (Δ) were 0.5 and 5.0 ms, respectively.

PEG self-diffusion measurements were performed on a 500 MHz Bruker spectrometer equipped with a field gradient probe with 5 mm NMR tubes. Diffusion spectra were acquired with a stimulated echo sequence using bipolar gradients (STE-BP) and a 3-9-19 WATERGATE pulse scheme to suppress the water signal. Experiments were carried out with 16 different values of g , ranging from ~ 0.25 to 5.00 T/m, with $\delta = 1.0$ ms, 16 scans and the recycle delay was set at 3 T_1 . Depending on the molecular weight of the PEG studied, Δ was adjusted to obtain a diffusion distance $z \sim 1.5 \mu\text{m}$ in the casein suspension, in accordance with the Einstein equation $z = (2 D_{\text{PEG}} \Delta)^{1/2}$. This procedure enabled molecular probes to cover a much greater distance than the casein micelle diameter (diameter around 150 nm^{32}).

NMR processing methods. All the data processing was performed with Matlab software. Monte-Carlo simulations were used for error calculations with 200 iterations, in agreement with the procedures described by Alper and Gelb (1990)³³. In a PFG-NMR sequence, the echo intensity of a single molecule (I) is described by:

$$I / I_0 = \exp(-k D) \quad (1)$$

where I_0 is the signal intensity in the absence of gradients and D the self-diffusion coefficient of the molecule studied. The values taken by k in a classic spin echo sequence (as for water self-diffusion measurements) are given by the following equation:

$$k = \gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta \quad (2)$$

However, in a STE-BP NMR sequence (as for PEG self-diffusion measurements) the equation is transformed into:

$$k = \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3 - \tau/2) \quad (3)$$

Here, γ is the gyromagnetic ratio (for protons $\gamma = 26.7520 \times 10^7 \text{ rad.T}^{-1}.\text{s}^{-1}$), g the amplitude of the gradient pulse, δ the gradient pulse duration, Δ the time between the leading edges of gradient pulses and τ the time between the end of each gradient and the next radiofrequency pulse.

In an ordinary high-field NMR proton spectrum, the PEG peak overlaps with casein signals at a shift of ~ 3.6 ppm. However, due to the very short relaxation times (T_1 , T_2) of casein protons, their signals were severely attenuated in the diffusion spectra and did not contribute to the PEG echo intensity. Casein signals were therefore always ignored and all self-diffusion coefficients were obtained by fitting **eq. 1** to the raw NMR data using non-linear least square methods.

RESULTS

Rheological parameters. The storage modulus (G'), the loss modulus (G'') and the phase angle (δ) recorded during the coagulation process are given in **Figure 1-a** for two repetitions.

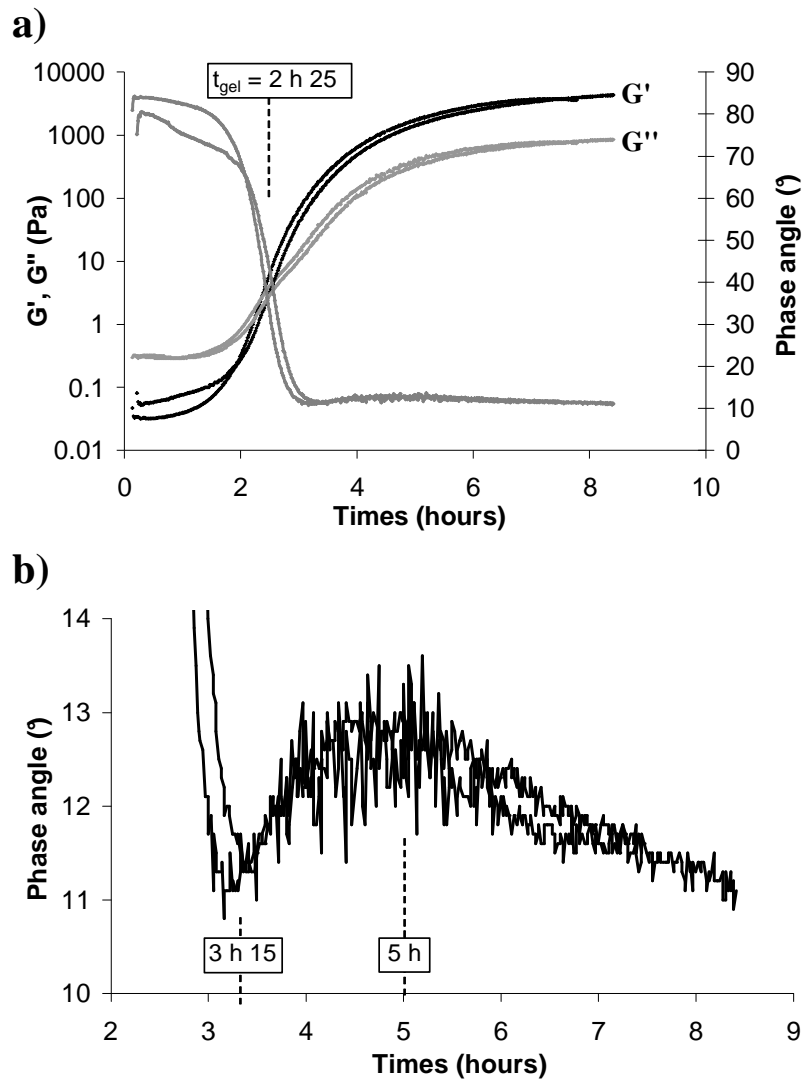


Figure 1. Rheological data according to time after addition of chymosin (two repetitions):
a) Evolution of storage modulus (G'), loss modulus (G'') and phase angle (δ); b)
Enlargement of phase angle evolution.

The transition from solution to gel occurred between approximately $t = 2$ and 3 h. The time at which G' and G'' were equal is often used to define the “gel time” parameter. In this study, it was found to be $t_{gel} = 2\text{ h } 25 \pm 3\text{ min}$. Although δ was relatively stable after the sol-gel transition (from $t \sim 3\text{ h } 15$), which is characteristic of a type of structural organization, G'

and G'' continued to increase (see **Figure 1-a**). This indicated an increase in the gel stiffness consistent with the increasing values measured with the penetration tests shown in **Table 2**. As expected, the hardness, or the strength at fracture when it occurred, also increased during this interval. It can be concluded from all these rheological findings that the junctions in the network became progressively stronger after gel formation. Besides these general trends, as illustrated in **Figure 1-b** the curve representing δ over time was not totally flat after the sol-gel transition. Just after aggregation (at $t \sim 3$ h 15) a local minimum in the phase angle occurred, indicating that the viscoelastic properties of the fresh gel were not totally stable. Such a phenomenon is therefore generally attributed to a transient gel structure. After this small reduction in gel elasticity (beyond $t \sim 5$ h) the phase angle gently decreased again to more elastic values.

Time after the chymosin addition	Stiffness (N/mm)	Hardness (N)	Strength at fracture (N)
3h47	0.023	0.27	
4h34	0.081	0.9	
5h19	0.151	-	0.85 at 4.7mm
5h58	0.214	-	1.15 at 4.7mm
6h42	0.256	-	1.39 at 4.8mm
7h08	0.321	-	1.65 at 4.8mm

Table 2. Textural properties of the enzymatic gel at different times after addition of chymosin at 20°C.

SEM images. SEM images of the gel are shown at different times after enzyme addition in **Figure 2**. As can be seen from **Figure 2-a, 2-c** and **2-e**, the gel microstructure appeared homogeneous at a length scale of a few micrometers. **Figure 2-a** and **2-b** show that the network soon after gel formation was constituted of casein aggregates composed of small spherical particles with a mean diameter around 100-150 nm. At this point the gel was coarse, with small pores. At $t = 8$ h 45, the network organization was very similar, but larger empty spaces were observed at the same time, indicating that the gel structure had evolved (**Figure 2-c** and **2-d**). Finally, 24 h after the addition of chymosin, the microstructure appeared clearly more branched (**Figure 2-e** and **2-f**). The casein particles had partially fused together, thin strands were formed and pore sizes were increased. A clear evolution of the network towards a more “open” microstructure was thus observed during the hours following gel formation.

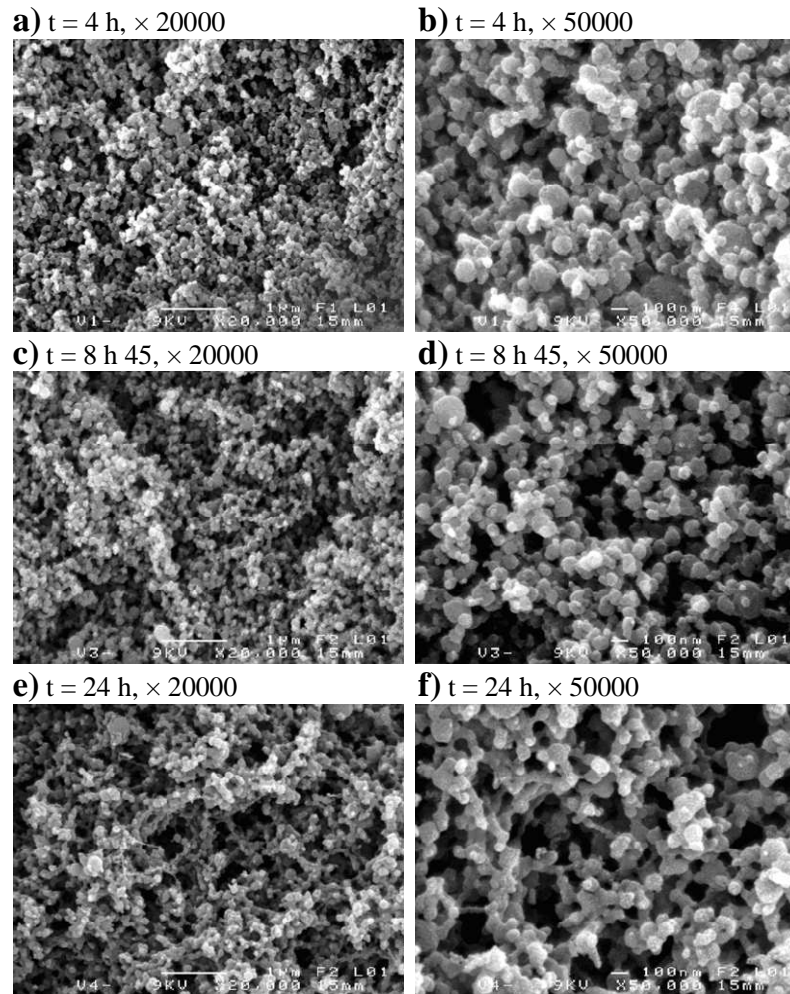


Figure 2. SEM images of enzymatic gels at two magnifications and at different times after addition of chymosin: a) and b) $t = 4$ h, c) and d) $t = 8$ h 45 and e) and f) $t = 24$ h.

Self-diffusion in water and casein suspensions. The diffusion coefficients of water and the two PEGs were carefully measured in a $\text{H}_2\text{O}/\text{NaCl}$ solution (0.1 M) and in the casein suspension before the dynamic studies. The results obtained are presented in **Table 3** with the polydispersity index of each polymer. The diffusion coefficients obtained in water were in good agreement with previous studies^{11,30,31,34} and, as both PEGs were fairly monodisperse, all the echo attenuations were linear, indicating that there was no need to account for polydispersity effects. Such linear behavior was always observed in this study. Reduced self-diffusion coefficients (D_R) in the casein suspension were calculated to highlight the casein obstruction effect. They were obtained by dividing the self-diffusion coefficient in the casein suspension (D) by that in water (D_0). As can be seen from **Table 3**, the hindrance of diffusion by casein micelles was greater when molecules were larger. These findings are consistent with previous studies in which the casein powder was rehydrated in D_2O ^{30,31}.

Diffusing molecule	M_w/M_n	D_0 ($m^2 \cdot s^{-1}$)	$D_R = D / D_0$
H ₂ O	/	1.98×10^{-9}	0.71
PEG 620 g/mol	1.06	2.67×10^{-10}	0.63
PEG 96750 g/mol	1.06	1.61×10^{-11}	0.34

Table 3. Self-diffusion coefficients (D_0) and reduced self-diffusion coefficients (D_R) of the molecules studied at 20°C in a H₂O/NaCl solution (0.1 M) and in a casein suspension of 15 g casein per 100 g of water, respectively.

Stability of the repeated self-diffusion experiments. To follow the evolution of a diffusion coefficient during the coagulation process, NMR self-diffusion experiments were repeated over a long period of time. The time-stability of this procedure was therefore beforehand verified. Normalized self-diffusion coefficients obtained for H₂O at 20 MHz and the 620 g/mol PEG at 500 MHz in a 0.1 M NaCl/H₂O solution are presented in **Figure 3** in relation to time. At both 20 and 500 MHz, the mean values remained stable for all experiments, thus demonstrating that no drift occurred with time. In addition, good repeatability was found for both types of diffusion experiment as the standard deviations were 0.5% and 1.04% at 20 and 500 MHz, respectively. All these findings indicate that, in contrast to small variations between two nearby points, durable changes in the mean value of diffusion coefficients cannot be attributed to the measurement process itself.

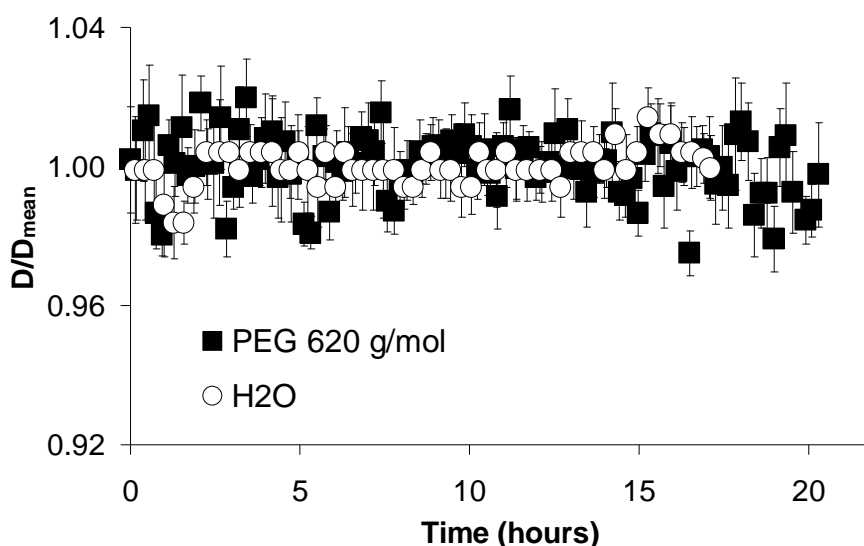


Figure 3. Repeated self-diffusion measurements in a 0.1 M NaCl/H₂O solution at 20°C. The diffusion coefficients of H₂O and the 620 g/mol PEG were obtained at 20 MHz and 500 MHz, respectively. Error bars represent the uncertainties given by the Monte-Carlo simulations.

Molecular self-diffusion during casein coagulation. The self-diffusion coefficient of each PEG and H₂O in the casein suspension (D_{sol}) was used to normalize all self-diffusion coefficients obtained during the coagulation process. The dilution induced by the inoculation of chymosin was ignored as the amount added was only about 0.7% of the total sample mass.

The results obtained for the diffusion of water are illustrated in **Figure 4**. As previously reported^{31,35}, our findings suggest that the diffusion rate of H₂O was unaffected by the coagulation process. The variations in the diffusion coefficient observed with time were most probably caused by evaporation-condensation phenomena as tiny water drops were found on the tube wall at the end of the experiment.

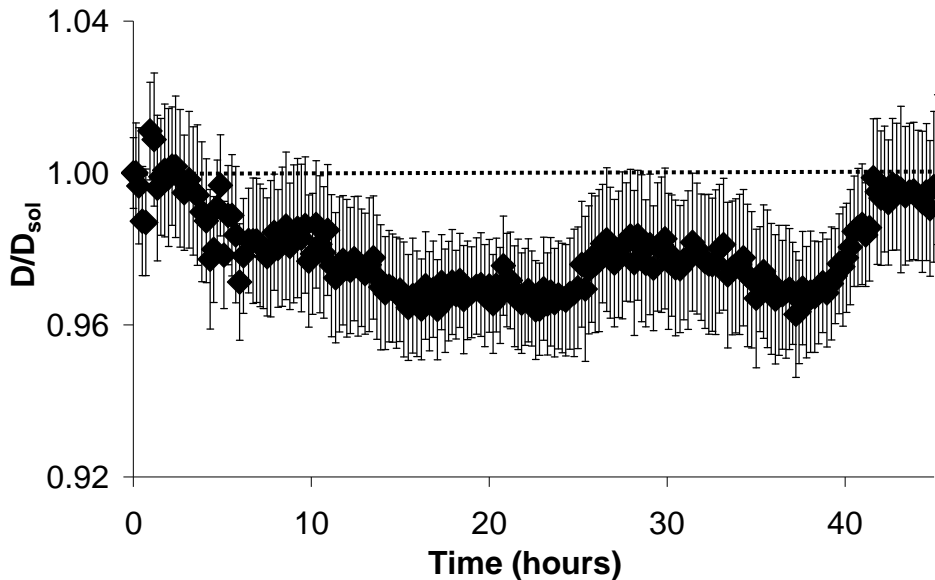


Figure 4. Evolution of self-diffusion coefficient of H₂O over time after addition of chymosin. Measurements were performed at 20°C and 20 MHz. Error bars represent the uncertainties given by the Monte-Carlo simulations.

The results obtained during the coagulation process for the 96750 g/mol PEG are presented in **Figure 5** in relation to time after the addition of enzyme. Two different phases clearly appeared. During the first period (from $t = 0$ to about 5 h) the diffusion coefficient of the polymer remained stable. During the second period it then regularly increased with time. After 24h, the diffusion coefficient was enhanced by approximately 20%, which is consistent with results previously reported in casein gels made with heavy water^{30,31}.

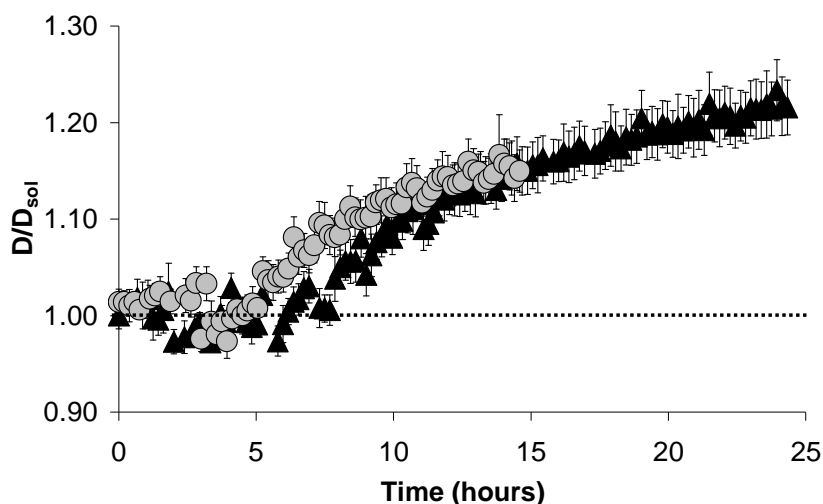


Figure 5. Evolution of 96750 g/mol PEG self-diffusion coefficient over time after addition of chymosin. Measurements were performed at 20°C and 500 MHz. Two repetitions are shown and error bars represent the uncertainties given by the Monte-Carlo simulations.

In fact, despite the smaller extent of variations, the opposite trend was found for the 620 g/mol PEG (**Figure 6**). Between $t = 0$ and about 5 h, the diffusion coefficient of the polymer was unchanged, but beyond this period a small and regular decrease in the diffusion rate was observed. Note that evaporation phenomena cannot explain this latter result because this phenomenon was never observed in samples analyzed at 500 MHz. This is understandable because the surface area in the NMR tube used (5 mm instead of 10 mm at 20 MHz) was very small compared to the total sample volume. Moreover, such an interpretation would hardly explain the shape of the curve.

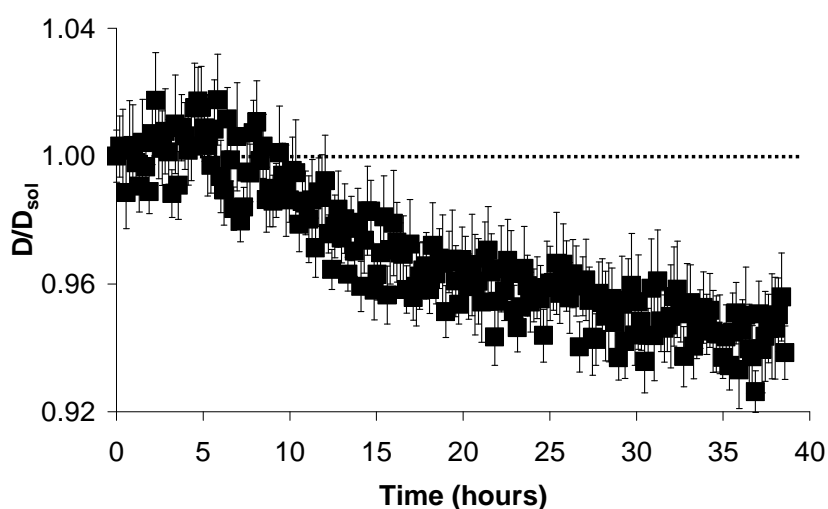


Figure 6. Evolution of 620 g/mol PEG self-diffusion coefficient over time after addition of chymosin. Measurements were performed at 20°C and 500 MHz. Error bars represent the uncertainties given by the Monte-Carlo simulations.

DISCUSSION

Characterization of the coagulation process. The coagulation induced by chymosin action is generally broken down into three phases: enzyme action, aggregation and gel ageing^{36,37}. First, the enzyme specifically splits off the κ -casein which is at the surface of the supramolecular edifice. This reduces the steric and electrostatic repulsions between the casein particles and the suspension becomes unstable. In the second phase, the resulting para-casein micelles spontaneously aggregate and form a macroscopic network. In this study, this phenomenon was characterized by the rapid increase in G' and G'' and the sudden decrease in δ between $t \sim 2$ h and $t \sim 3$ h 15 (**Figure 1**). Finally, the third phase corresponds to the ageing of the gel and is characterized by the occurrence of structural changes in the casein network. This latter phase is of primary importance because it is common to all casein gels, and also because the gel microstructure is directly related to the physical characteristics of the product. Although the nature of the stages is different, they are not clearly separated in time. The aggregation phase always starts before the end of the enzymatic reaction^{38,39} and occurs at an even lower degree of κ -casein hydrolysis when the casein concentration is increased^{37,40}.

According to our findings, the gel ageing phase was characterized by an increase in gel stiffness (**Table 2**) consistent with the evolutions of G' and G'' (**Figure 1-a**). In addition, the gel microstructure became progressively more “open” as shown by the SEM images (**Figure 2**), indicating that the casein particles had fused together and progressively became more compact. All these findings are in agreement with the literature^{1,6,41}. To describe this particular phase, Mellema *et al.*¹ proposed a general model based on several types of rearrangement occurring at different length scales. According to them, particle fusion and inter-particle rearrangements result in the formation of straight and progressively thinner strands, with more bonds per casein aggregate, and hence stronger junctions. This consequently leads to stretching of strands and stiffening of the gel¹. Although the mechanisms involved are not fully understood, all authors agree that rearrangements give rise to local matrix fusion and compaction, resulting in a gel with larger pores and a higher permeability^{1,2,4,6,37,41-43}. After network establishment, the progressive reorganization of the gel microstructure is thus accompanied by a reduction in the amount of water contained in casein particles; the aggregates become denser.

Background on self-diffusion in casein samples. Previous studies have shown that probe diffusion in casein suspensions and gels is greatly dependent on both the volume fraction occupied by casein particles and the probe size^{30,31}. The reduction in diffusion coefficient for a given volume fraction of casein particles is smaller for smaller probes (e.g. **Table 3**). This phenomenon was previously explained by assuming a model with two diffusion pathways, one around and one through the casein micelles³⁰. According to the “two site” model, variations in the diffusion rate of a molecule only depend on its ability to diffuse through the casein particles and the volume fraction occupied by them (see ref³⁰ and ref⁴⁴ for more details). This model therefore implies that the diffusion of larger molecules is more affected by the presence of casein particles because they can less easily diffuse through them (**Table 3**). This means that the “through the casein particles” diffusion component for the 96750 g/mol PEG is much smaller than those for water and the small PEG. Such an explanation was proposed because casein particles cannot be considered as impenetrable particles since they are known to be very porous and highly hydrated. Indeed, casein micelles are generally reported to be constituted of approximately 3 or 4 g of water per 1 g casein⁴⁵⁻⁴⁹, and several studies have shown that large molecules such as β -casein (24000 g/mol)^{50,51} and transglutaminase (45000 g/mol)⁵²⁻⁵⁵ can enter a casein micelle.

To explain the probe size dependence, another approach consistent with the one given above can be proposed on the basis of the recent results obtained by Babu *et al.*⁵⁶. They showed by computer simulations that the diffusion of a spherical probe in hard sphere suspensions and gels is mainly dependent on the volume fraction that is accessible to the diffusing particle. According to this interpretation, the diffusion of larger probes would thus be more affected in the presence of casein particles because they have a smaller accessible volume fraction. It should be noted that the situation was slightly different in this study as PEGs are easily deformable and can change their shape according to their environment^{57,58}. They can therefore diffuse through small spaces compared to their hydrodynamic diameter by adopting a more elongated conformation. Although this phenomenon complicates the modeling of diffusion data, we may suppose that the following two assumptions are still tenable:

- The accessible volume fraction is a key parameter to explain our diffusion results.
- The volume fractions that are accessible to the molecules studied are different.

In addition to PEG flexibility, the three molecules used in this study are much smaller than casein particles, which have a mean diameter around 150 nm³². The accessible volume surrounding the casein particles should therefore be of the same order of magnitude for water and both PEGs. The differences between the volume fractions which are accessible to the molecules investigated would thus be mainly explained by different amounts of accessible space inside the casein particles. As previously stated, this latter interpretation is thus very consistent with the previous interpretation.

Self-diffusion during the coagulation process. As shown in **Figure 4**, **Figure 5** and **Figure 6**, different evolutions in the diffusion rate of the molecules studied occurred during the coagulation process. The diffusion of water remained stable throughout the experiment while those of both PEGs started to change after approximately five hours of coagulation. Moreover, the diffusion coefficient of the small PEG progressively decreased whereas the opposite occurred for the large PEG. These results were unexpected because we have to consider that the same causes can lead to different evolutions of diffusion rates depending on the molecular weight of the probe. In other words, the diffusing molecules did not experience the same phenomena because of their different sizes. Scaling effects must therefore be considered.

At $t \sim 5$ h, the formation of the macroscopic network was complete (**Figure 1**). The changes in both PEG diffusion rates observed should therefore be a consequence of the rearrangement processes that occur during gel ageing (**Figure 5** and **Figure 6**). As previously described, this phase was characterized by a compaction of the obstructing elements and hence a reduction in the amount of water contained by the casein particles (**Figure 2**). According to the “two site” model, this phenomenon should have two opposite effects on the diffusion of probes. On the one hand, more molecules should freely diffuse because more empty spaces are created inside the gel microstructure. This should result in an enhanced diffusion coefficient. On the other hand, the “through the casein aggregates” diffusion component would be expected to decrease as they become denser, and this should lead to a reduction in the diffusion rate. Note that exactly the same conclusions can be reached in terms of accessible volume fraction by distinguishing the accessible volumes which are outside the casein particles from those which are inside. By following this interpretation, it becomes

possible to explain how probe diffusion coefficients can vary differently depending on the size of the diffusing molecule and hence on the length scale probed.

First of all, the diffusion rate of water molecules remained stable throughout the coagulation process as evaporation-condensation phenomena explain the instability observed (**Figure 4**). Water diffusion was thus not affected by the changes in the casein particle structure nor by the reduction in casein network volume. The obstruction effect seemed therefore to be explained by the proteins themselves and water molecules should be considered as “point particles”, i.e. the volume fraction that is accessible to water does not depend on the matrix structure. These findings confirm previously reported results obtained in casein³⁵ and in whey protein⁵⁹ matrices since they were fully explained by the protein content and their local interactions with water.

The diffusion coefficient of the 96750 g/mol PEG progressively increased with time after $t \sim 5$ h (**Figure 5**). Its diffusion rate was thus mainly affected by the progressive increase in the casein-free volume. This is understandable because in the suspension its diffusion coefficient was severely reduced compared to those of water and the small polymer (**Table 3**). It would therefore be dangerous to make assumptions regarding the ability of this large PEG to diffuse through casein particles. If it cannot, the interpretation is straightforward. The self-diffusion coefficient of this polymer can only increase because the volume fraction that is accessible to this probe increases when the volume occupied by the obstructing elements decreases. If this polymer can in fact diffuse through casein particles, this diffusion component must be small and may therefore not be significantly further reduced when the casein aggregates become denser. The effect produced by the progressive increase in the casein-free volume fraction may thus still prevail. Whatever the case, the results presented in **Figure 5** clearly demonstrate that the diffusion rate of the 96750 g/mol PEG was very sensitive to the reduction in the casein particle water content, and hence to the progressive increase in gel porosity.

Turning to the small probe results, the reduced diffusion coefficient of the 620 g/mol PEG in casein suspension was slightly smaller than that of water (**Table 3**). We can therefore also assume a diffusion behavior with two diffusion pathways. However, in contrast to what was observed for water and the large PEG, a small decrease in the diffusion rate of the 620

g/mol PEG progressively occurred after $t \sim 5$ h (**Figure 6**). According to the two site model, despite the increase in the casein-free volume, the “through the casein aggregates” diffusion component was sufficiently reduced to induce a decrease in the overall diffusion coefficient. This leads to the interesting conclusion that when casein aggregates become denser, the consequent reduction in the “through the casein aggregates” diffusion component is greater for the polymer than for water. This appears to be logical because the diffusion of this PEG was already more hindered than that of water in the casein suspension (**Table 3**). The evolution of the 620 g/mol PEG self-diffusion coefficient seems therefore to be sensitive to phenomena occurring inside the casein aggregates and thus to their structure.

It is noteworthy that, in general, the casein aggregate compaction might not be the only factor influencing probe diffusion. Indeed, network densification is a consequence of structural rearrangements on a micrometric scale, but other effects necessarily occur at smaller levels including the molecular scale^{60,61}. At such length scales (i.e. inside particles), and without considering protein crowding, it is not possible to determine what the impact of the structural rearrangement processes on molecular diffusion might be. The 620 g/mol PEG diffusion could therefore also be sensitive to other phenomena. Similarly, and particularly for molecules which cannot enter casein particles, in addition to casein-free volume variations (i.e. porosity effects), changes in the pore connectivity (i.e. tortuosity effects) should also rigorously be considered. Nevertheless, we can be confident that the main phenomenon explaining our diffusion results was the progressive network compaction, both because of its extent (**Figure 2**) and because the curves obtained for the small and the large PEG were remarkably symmetric.

However, the diffusion of the three molecules studied was unaffected by the first two stages of coagulation, i.e. the enzymatic and the aggregation phases (**Figure 4**, **Figure 5** and **Figure 6**). During the first stage, chymosin cleaves out one part of each κ -casein from the surface of the casein micelles. This results in a small reduction in their mean diameter (around 15 nm^{38,62,63}) but, according to Sandra *et al.*³⁸, no significant changes occur in the internal structure of casein particles. This is consistent with our findings, since the structure of the colloidal particles did not seem to be affected at the scale probed by the 620 g/mol PEG during the enzymatic reaction. Such a decrease in particle size could also be thought to result in an increase in the 96750 g/mol PEG diffusion rate, but this reasoning would overlook the

fact that the obstacles removed are released in the serum phase. The non-influence of the aggregation step can also be easily explained. Indeed, according to the concentration used and the micelle size, when compared to the PEG diffusion coefficients, casein micelles can already be considered as static in the suspension.

After aggregation (from $t \sim 3$ h 15 to $t \sim 4$ h) the continuous increase in G' and G'' (**Figure 1-a**) and the evolution of δ (**Figure 1-b**) indicate that structural changes occurred as soon as a gel was formed. These findings are consistent with the fact that the different phases of the coagulation are not clearly separate in time, but they also imply that the reduction in casein water content did not start simultaneously with the structural rearrangement processes. However, at $t \sim 5$ h, when both PEG diffusion rates started to vary, the evolution in the phase angle changed again (**Figure 1-b**). Such a small and progressive decrease in the phase angle is usually difficult to analyze but, according to our findings, although this phenomenon is necessarily caused by a structural reorganization inside the particles, it seems to be linked to a gradual reduction in the casein volume fraction.

CONCLUSIONS

We revealed by an original designed experiment that probe diffusion measurements can give dynamic information regarding the structural modifications that take place during the gel ageing phase of a casein coagulation process. Moreover, depending on the size of the diffusing molecule, information could be obtained at different length scales. Water diffusion was only affected by protein content and not by changes in the structure of the casein aggregates, in contrast to the diffusion of a 620 g/mol PEG. The diffusion of a 96750 g/mol PEG was not affected by the sol-gel transition but was closely related to the progressive rise in gel porosity. These findings show the importance of the rearrangement processes to explain milk gel properties. PFG-NMR and viscoelastic investigations were found to be highly complementary. For example, we showed that the progressive compaction of casein aggregates did not directly start after gel formation and was probably related to a small and gradual decrease in the phase angle. Moreover, few techniques exist to study the evolution of fresh gel properties and most of them are invasive and non-continuous, as for instance permeametry experiments which provide information regarding gel permeability. In contrast, repeated probe diffusion measurements are easy to set up, and both the extent and the rate at which the network compaction increase can be estimated in only one run. It may therefore become a valuable tool to study the impact of various parameters on rearrangement processes.

Probe diffusion measurements during the coagulation processes induced by acidification alone and with the concomitant action of chymosin are in progress to obtain further insight regarding these phenomena.

Acknowledgements

The authors thank the Regional Council of Brittany and SOREDAB for financial support. We are grateful to Armel Guillermo and Arnaud Bondon for their help with NMR experiments and Joseph Le Lannic for assistance with the SEM experiments. We thank Jean-Michel Soulié; Sandrine Eliot-Godéreaux; Pascale Persenot and Fabien Gutter from SOREDAB for helpful discussions and assistance with the rheological and mechanical experiments, and Minale Ouethrani for participating in the rheological and SEM experiments.

REFERENCES

1. Mellema, M., P. Walstra, J.H.J. Van Opheusden, and T. Van Vliet, *Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels*. Advances in Colloid and Interface Science, **2002**. 98(1): p. 25-50.
2. Lagoueyte, N., J. Lablee, A. Lagaude, and B.T. De la Fuente, *Temperature affects microstructure of renneted milk gel*. Journal of Food Science, **1994**. 59(5): p. 956-959.
3. Lucey, J.A., T. van Vliet, K. Grolle, T. Geurts, and P. Walstra, *Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 1. Rheological properties*. International Dairy Journal, **1997**. 7: p. 381-388.
4. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid*. International Dairy Journal, **2001**. 11: p. 559-565.
5. Aichinger, P.A., M. Michel, C. Servais, M.L. Dillmann, M. Rouvet, N. D'Amico, R. Zink, H. Klostermeyer, and D.S. Horne, *Fermentation of a skim milk concentrate with Streptococcus thermophilus and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, **2003**. 31: p. 243-255.
6. Mellema, M., J.W.M. Heesakkers, J.H.J. van Opheusden, and T. van Vliet, *Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry*. Langmuir, **2000**. 16(17): p. 6847-6854.
7. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone*. Food Research International, **1998**. 31(2): p. 147-155.
8. Van Vliet, T., C.M.M. Lakemond, and R.W. Visschers, *Rheology and structure of milk protein gels*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2004**. 9(5): p. 298-304.
9. Mishra, R., S. Govindasamy-Lucey, and J.A. Lucey, *Rheological properties of rennet-induced gels during the coagulation and cutting process: Impact of processing conditions*. Journal of Texture Studies, **2005**. 36(2): p. 190-212.

10. Lopez, M.B., S.B. Lomholt, and K.B. Qvist, *Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effect of pH and enzyme concentration*. International Dairy Journal, **1998**. 8(4): p. 289-293.
11. Johansson, L., U. Shantze, and J.E. Lofroth, *Diffusion and interaction in gels and solutions. 2. Experimental results on the obstruction effect*. Macromolecules, **1991**. 24(22): p. 6019-6023.
12. Johansson, L., C. Elvingson, and J.E. Lofroth, *Diffusion and interaction in gels and solutions. 3. Theoretical results on the obstruction effect*. Macromolecules, **1991**. 24: p. 6024-6029.
13. Masaro, L., M. Ousalem, W.E. Baille, D. Lessard, and X.X. Zhu, *Self-diffusion studies of water and poly(ethylene glycol) in solutions and gels of selected hydrophilic polymers*. Macromolecules, **1999**. 32(13): p. 4375-4382.
14. Brown, W. and P. Stilbs, *Self-diffusion of poly(ethylene oxide) in aqueous dextran solutions measured using FT-pulsed field gradient NMR*. Polymer, **1982**. 24: p. 188-192.
15. Walderhaug, H. and B. Nystrom, *A pulsed field gradient NMR study of poly(oxyethylene) diffusion in aqueous solutions and gels of ethyl(hydroxyethyl) cellulose-sodium dodecyl sulphate systems*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **1999**. 149: p. 379-387.
16. Petit, J.M., X.X. Zhu, and P.M. Macdonald, *Solute probe diffusion in aqueous solutions of poly(vinyl alcohol) as studied by pulsed-gradient spin-echo NMR spectroscopy*. Macromolecules, **1996**. 29(1): p. 70-76.
17. Jo, B.W., M. Hess, and M. Zahres, *Self-diffusion of poly(ethylene oxide) - modified paclitaxel in dilute aqueous solutions*. Materials Research Innovations, **2003**. 7(3): p. 178-182.
18. Matsukawa, S. and I. Ando, *A study of self-diffusion of molecules in polymer gel by pulsed-gradient spin-echo ¹H NMR*. Macromolecules, **1996**. 29: p. 7136-7140.
19. Matsukawa, S. and I. Ando, *Study of self-diffusion of molecules in a polymer gel by pulsed-gradient spin-echo ¹H-NMR. 2 : Intermolecular hydrogen-bond interaction between the probe polymer and network polymer in N,N-dimethylacrylamide-acrylic acid copolymers gel systems*. Macromolecules, **1997**. 30(26): p. 8310-8313.

20. Fleischer, G., J. Karger, F. Rittig, P. Hoerner, G. Riess, K. Schmutzler, and M. Appel, *Liquid polyethylene glycol dispersed in a poly(styrene)-b- poly(ethylene/butylene)-b- poly(styrene) elastomer: Determination of morphology and molecular mobility by light and electron microscopy as well as nuclear magnetic resonance self- diffusion and T-2 measurements*. *Polymers for Advanced Technologies*, **1998**. 9: p. 700-708.
21. Yamane, Y., I. Ando, F.L. Buchholz, A.R. Reinhardt, and S. Schlick, *Detection of spatial inhomogeneity in poly(acrylic acid) gels by measuring time-dependent diffusion coefficients of a probe in NMR experiments: Effect of the degree of cross-linking and degree of swelling*. *Macromolecules*, **2004**. 37(26): p. 9841-9849.
22. Amsden, B., *Solute diffusion within hydrogels : Mechanisms and models*. *Macromolecules*, **1998**. 31(23): p. 8382-8395.
23. Baldursdottir, S.G., A.-L. Kjoniksen, and B. Nystrom, *The effect of riboflavin- photoinduced degradation of alginate matrices on the diffusion of poly(oxyethylene) probes in the polymer network*. *European Polymer Journal*, **2006**. 42(11): p. 3050-3058.
24. Amsden, B., *Diffusion in Polyelectrolyte hydrogels: Application of an Obstruction-scaling model to solute diffusion in calcium alginate*. *Macromolecules*, **2001**. 34(5): p. 1430-1435.
25. Kwak, S. and M. Lafleur, *Self-diffusion of macromolecules and macroassemblies in curdlan gels as examined by PFG-SE NMR technique*. *Colloids and Surfaces A- Physicochemical and Engineering Aspects*, **2003**. 221: p. 231-242.
26. Nyden, M., O. Soderman, and G. Karlstrom, *A PFG NMR self-diffusion investigation of probe diffusion in an ethyl(hydroxyethyl)cellulose matrix*. *Macromolecules*, **1999**. 32(1): p. 127-135.
27. Croguennoc, P., T. Nicolai, M.E. Kuil, and J.G. Hollander, *Self-diffusion of native proteins and dextran in heat-set globular protein gels*. *Journal of Physical Chemistry B*, **2001**. 105(24): p. 5782-5788.
28. Colsenet, R., O. Soderman, and F. Mariette, *Effects of ionic strength and denaturation time on polyethyleneglycol self-diffusion in whey protein solutions and gels visualized by nuclear magnetic resonance*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(14): p. 5105-5112.

29. Colsenet, R., O. Soderman, and F.O. Mariette, *Pulsed field gradient NMR study of poly(ethylene glycol) diffusion in whey protein solutions and gels*. *Macromolecules*, **2006**. 39(3): p. 1053-1059.
30. Colsenet, R., O. Soderman, and F. Mariette, *Effect of casein concentration in suspensions and gels on poly(ethylene glycol)s NMR self-diffusion measurements*. *Macromolecules*, **2005**. 38(22): p. 9171-9179.
31. Le Feunteun, S. and F. Mariette, *Impact of casein gel microstructure on self-diffusion coefficient of molecular probes measured by 1H PFG-NMR*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**. submitted.
32. McMahon, D.J. and R.J. Brown, *Composition, structure, and integrity of casein micelles: A review*. *Journal of Dairy Science*, **1984**. 67: p. 499-512.
33. Alper, J.S. and R.I. Gelb, *Standard errors and confidence intervals in nonlinear regression: comparison of monte carlo and parametric statistic*. *Journal of Physical Chemistry*, **1990**. 94: p. 4747-4751.
34. Masaro, L., X.X. Zhu, and P.M. MacDonald, *Study of the self-diffusion of poly(ethylene glycol)s in poly(vinyl alcohol) aqueous systems*. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, **1999**. 37(17): p. 2396-2403.
35. Mariette, F., D. Topgaard, B. Jönsson, and O. Söderman, *¹H NMR diffusometry study of water in casein dispersion and gels*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50(15): p. 4295-4302.
36. Zoon, P., T. Van Vliet, and P. Walstra, *Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 1. Introduction*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **1988**. 42: p. 249-269.
37. Karlsson, A.O., R. Ipsen, and Y. Ardo, *Rheological properties and microstructure during rennet induced coagulation of UF concentrated skim milk*. *International Dairy Journal*, **2007**. 17(6): p. 674-682.
38. Sandra, S., M. Alexander, and D.G. Dalgleish, *The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy*. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2007**. 308(2): p. 364-373.
39. Walstra, P. and T. Van Vliet, *The physical chemistry of curd making*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **1986**. 40: p. 241-259.

40. Sharma, S.K., G.S. Mittal, and A.R. Hill, *Effect of milk concentration, pH and temperature on kappa-casein hydrolysis at aggregation, coagulation and curd cutting times of ultrafiltered milk*. *Milchwissenschaft*, **1994**. 49(8): p. 450-453.
41. Bauer, R., M. Hansen, S. Hansen, L. Ogendal, S. Lomholt, K. Qvist, and D. Horne, *The structure of casein aggregates during renneting studied by indirect fourier transformation and inverse laplace transformation of static and dynamic light-scattering data, respectively*. *Journal of Chemical Physics*, **1995**. 103(7): p. 2725-2737.
42. Lucey, J.A., T. van Vliet, K. Grolle, T. Geurts, and P. Walstra, *Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- $[\delta]$ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties*. *International Dairy Journal*, **1997**. 7: p. 389-397.
43. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono-delta-lactone*. *Journal of Dairy Research*, **2000**. 67(3): p. 415-427.
44. Jönsson, B., H. Wennerstrom, P.G. Nilsson, and P. Linse, *Self-diffusion of small molecules in colloidal systems*. *Colloid & Polymer Science*, **1986**. 264: p. 77-88.
45. Kumosinski, T.F., H. Pessen, H.M. Farrell, Jr., and H. Brumberger, *Determination of the quaternary structural states of bovine casein by small-angle X-Ray scattering: submicellar and micellar forms*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1988**. 266: p. 548-561.
46. Guillaume, C., L. Jimenez, J.L. Cuq, and S. Marchesseau, *An original pH-reversible treatment of milk to improve rennet gelation*. *International Dairy Journal*, **2004**. 14(4): p. 305-311.
47. Gastaldi, E., A. Lagaude, S. Marchesseau, and B.T. De la Fuente, *Acid milk gel formation as affected by total solids content*. *Journal of Food Science*, **1997**. 62(4): p. 671-675.
48. Vetier, N., S. Banon, J.P. Ramet, and J. Hardy, *Casein micelle solvation and fractal structure of milk aggregates and gels*. *Lait*, **2000**. 80(2): p. 237-246.

49. Karlsson, A.O., R. Ipsen, K. Schrader, and Y. Ardo, *Relationship between physical properties of casein micelles and rheology of skim milk concentrate*. Journal of Dairy Science, **2005**. 88(11): p. 3784-3797.
50. Dalgleish, D.G. and J.R. Law, *pH-induced dissociation of bovine casein micelles. 2. Mineral solubilization and its relation to casein release*. Journal of Dairy Research, **1989**. 56: p. 727-735.
51. Creamer, K., G.P. Berry, and O.E. Mills, *A study of the dissociation of beta-casein of the bovin casein micelle at low temperature*. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, **1997**. 12: p. 58.
52. De Kruif, C.G., R. Tuinier, C. Holt, P.A. Timmins, and H.S. Rollema, *Physicochemical study of kappa- and beta-casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase*. Langmuir, **2002**. 18(12): p. 4885-4891.
53. O'Connell, J.E. and C.G. De Kruif, *beta-casein micelles; cross-linking with transglutaminase*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2003**. 216(1-3): p. 75-81.
54. Schorsch, C., H. Carrie, A.H. Clark, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 519-528.
55. Schorsch, C., H. Carrie, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 529-539.
56. Babu, S., J.-C. Gimel, and T. Nicolai, *Tracer diffusion in colloidal gels*. e-print cond-mat/0705.1266v1.
57. De Gennes, P.G., *Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles*. Journal of Chemical Physics, **1971**. 55(2): p. 572 -579.
58. De Gennes, P.G., *Brownian motions of flexible polymer chains*. Nature, **1979**. 282: p. 367-370.
59. Colsenet, R., M. Cambert, and F. Mariette, *NMR relaxation and water self-diffusion studies in whey protein solutions and gels*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**. 53: p. 6784-6790.

60. Horne, D.S., *Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products*. International Dairy Journal, **1998**. 8(3): p. 171-177.
61. Horne, D.S., *Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2003**. 213: p. 255-263.
62. Alexander, M. and D.G. Dalgleish, *Application of transmission diffusing wave spectroscopy to the study of gelation of milk by acidification and rennet*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, **2004**. 38: p. 83-90.
63. Dwyer, C., L. Donnelly, and V. Buckin, *Ultrasonic analysis of rennet-induced pre-gelation and gelation processes in milk*. Journal of Dairy Research, **2005**. 72(3): p. 303-310.

Chapitre V

Publication n°3 :

Evolution de la diffusion
de molécules-sonde
au cours de coagulations
acide et mixte

Effet de l'acidification avec et sans présure sur une matrice caséique concentrée : Etude en continu de la diffusion de molécules-sonde par RMN

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication acceptée à paraître dans *Macromolecules*.

Dans cette étude, la même approche expérimentale que pour la coagulation présure a été employée au cours des coagulations acide et mixte. Les résultats obtenus montrent que les diffusions des PEGs de 620 et 96750 g/mol varient toutes deux de façon non-monotone au cours des deux types de coagulation, et ce, quel que soit l'état de la matrice (liquide ou gélifié).

Les variations du coefficient de diffusion du PEG de 96750 g/mol ont été expliquées par des changements de volume des particules et agrégats caséiques. Avant l'agrégation, la diffusion de cette sonde est donc sensible à la taille des particules colloïdales. En revanche, contrairement à ce qui avait été observé lors de la coagulation présure, l'évolution de la diffusion du PEG de 620 g/mol n'était plus « symétrique » à celle observée pour le PEG de plus grande taille. Ces données ne peuvent s'expliquer qu'en considérant que la diffusion du petit PEG est sensible à la structure interne des agrégats caséiques.

Ces travaux permettent de confirmer les précédents résultats tout en allant plus loin dans la compréhension des mécanismes expliquant les effets de structure sur la diffusion moléculaire. De plus, la comparaison de l'ensemble des résultats obtenus de façon continue permet de tirer des conclusions intéressantes sur certains mécanismes liés la contraction des particules et du réseau caséique.

Effects of acidification with and without rennet on a concentrated casein system: A kinetic NMR probe diffusion study

*Steven Le Feunteun, François Mariette**

Cemagref, Process Engineering Technology Research Unit, CS 64426, 17 avenue de Cucillé,
35044 Rennes, Cedex, France

* Corresponding author:

François Mariette

Tel: 33 (0)223482121

Fax: 33(0)223482115

E-mail address: Francois.Mariette@cemagref.fr

ABSTRACT

The self-diffusion coefficient of a 620 g/mol and a 96750 g/mol poly(ethylene glycol) (PEG) were measured by pulsed field gradient (PFG)-NMR throughout the coagulation processes of a concentrated casein suspension induced by acidification alone and with the concomitant action of chymosin. The diffusion of water molecules was also investigated during the acidification process. In all experiments, the diffusion coefficient of the molecule studied was modified non-linearly, and the precise moments at which its evolution changed corresponded to key stages of both coagulation processes. These variations were not directly related to sol-gel transitions as revealed by rheological measurements, but were caused by other types of structural changes in the sample whatever its viscoelastic state (solution or gel). The diffusion of the large PEG was very sensitive to variations in the size of the casein particles and the casein aggregates constituting the network before and after gelation, respectively. In contrast, the diffusion of the small PEG and of water was sensitive to changes in the internal structure of the colloidal matter. The evolution of the sample microstructure could thus be monitored by diffusion measurements throughout the coagulation processes. In comparison, rheometry, stiffness measurements and scanning electron microscopy (SEM) revealed these modifications in the gel state only.

Keywords: Diffusion, NMR, PFG, PEG, PEO, probe, casein micelle, hydration, voluminosity, rearrangements, gel, porosity, permeability, acid, rennet, chymosin, GDL, milk.

INTRODUCTION

By studying the diffusion of probe molecules of various sizes, information can be obtained on the microstructure of a sample at different length scales^{1,2}. Such experiments have therefore been applied to a great variety of matrices, including polymers and proteins in both liquid and gel states³⁻¹³. The diffusion of poly(ethylene glycol)s (PEGs) measured by Pulsed Field Gradient (PFG)-NMR is probably the most widely used method to perform these investigations. PFG-NMR is a very powerful and non-destructive technique to determine self-diffusion coefficients^{14,15}, and PEG molecules selected as probes offer several advantages. They are water soluble, available in a wide range of molecular weights with low polydispersity indices and their NMR signal is a sharp band. Moreover, PEGs present very weak interactions with proteins¹⁶⁻²⁰, and there are numerous NMR diffusion sequences which include a solvent suppression scheme²¹⁻²⁴. With the latter two properties, PEG diffusion determined by PFG-NMR techniques makes possible the observation of obstruction effects in real biological matrices, i.e. without the need to resort to the use of heavy water.

We recently investigated the impact of rennet-induced coagulation of a milk system on the diffusion of different PEGs using PFG-NMR²⁵. However, rather than performing one experiment before gelation and one after, self-diffusion measurements were repeated throughout the coagulation process. With this experimental design, we showed that probe diffusion was not directly influenced by the formation of a network but was particularly sensitive to the structural modifications that take place during the ageing of the gel. Moreover, depending on the probe size, the evolution of their diffusion coefficient was related to changes in gel porosity and in the internal structure of the casein aggregates forming the network. This illustrates the potential of probe diffusion studies to reveal dynamic information on evolving systems, and particularly on dairy matrices.

However, rennet-induced coagulation is not the only process used to produce dairy gels. The formation of a milk gel, i.e. the destabilization of the colloidal system of dispersed casein micelles, can be obtained by the enzymatic action of chymosin (contained in rennet), by slow acidification, or by combinations of both²⁶. In milk, the stability of casein micelles is provided by the presence of κ -casein molecules protruding from their surface which prevents their aggregation by steric and electrostatic repulsion^{27,28}. In all types of coagulation, casein

micelles are first destabilized. The casein particles then aggregate and form a protein network which entraps the serum phase. However, the enzymatic and acid processes are different in many aspects. Whereas chymosin cleaves off the κ -casein molecules, acidification leads to several complex mechanisms before gel formation which have only partially been explained to date. The resulting gel properties are very different according to the process employed, and moreover they depend on various parameters such as temperature, milk pretreatment and casein concentration^{26,29}. The number of influencing parameters rises when combining chymosin action and acidification, particularly because there is considerable synergy between these two processes. A wide variety of coagulation processes and hence products can therefore be achieved, though many mechanisms remain unclear. Probe diffusion studies during such types of transformation may thus provide valuable information on the processes themselves and characterize the impact of various parameters.

The aim of the present study was to investigate the sensitivity of probe diffusion to the structural changes that occur during the coagulation of a casein suspension induced both by acidification alone and with the concomitant action of chymosin. The self-diffusion of a small and a large PEG were investigated by PFG-NMR throughout each type of coagulation, and that of water was studied during acid-induced coagulation. For both processes, the sol-gel transition was characterized by rheometry and, after the onset of gelation, stiffness measurements and scanning electron microscopy (SEM) were used to follow the evolution of the gel properties during ageing.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Native phosphocaseinate powder (INRA, Rennes, France) was used (powder composition was described in ref ²⁵). The PEG polymers were obtained from Polymer Laboratories (Marseilles, France), with average molecular masses of 620 and 96750 g/mol. Both polymers had the same low polydispersity index of 1.06, as indicated by the suppliers. All polymers, sodium azide (NaN₃) (Merck, Darmstadt, Germany), sodium chloride (NaCl) and Glucono-Delta-Lactone (GDL) with a purity above 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were used without further purification. The chymosin solution used was Chymax-Plus purchased from Chr-Hansen (Arpajon, France).

Acid and combined coagulations. All casein suspensions contained 16.18 ± 0.09 g of casein for 100 g of H₂O and were prepared according to the protocol described in ref ²⁵. To start the acidification process, GDL was added to the casein suspension at the proportion of 4.10 g to 100 g. A chronometer was started at the same time ($t = 0$ s) and the solution was vigorously stirred for 3 min. This procedure provided a pH of around 4.6 at $t = 24$ h. The same procedure was used to form combined gels, except that, in addition to GDL, 700 μ L of a chymosin dilution were added for 100 g of casein suspension. The chymosin dilution (1 mL in 99.0 g of distilled water) was always prepared and stored at 4°C approximately 20 min before each inoculation. Samples were then rapidly prepared for NMR and dynamic rheological measurements, whereas samples were stored at 20°C before analysis for SEM and Puncture experiments. No shrinkage of the gel was observed during the time scale of the experiments.

pH measurements. The pH was 6.80 in all the casein suspensions prepared (Schott, pH combination electrode type No N6280, Germany). In order to follow the acidification kinetics, the pH-electrode was placed in an extra amount of sample maintained at 20°C in a water bath after the total dissolution of the gelling agent(s). The pH-meter was connected to a data logger to record the pH every five minutes (STARLOG, Macro data logger, Model 7000B). An example of the curves obtained is presented in **Figure 1**. The equation relating the time after the addition of gelling agent(s) and pH was obtained by fitting all the data by Table Curve. This procedure enabled us to plot our diffusion and viscoelastic results against pH.

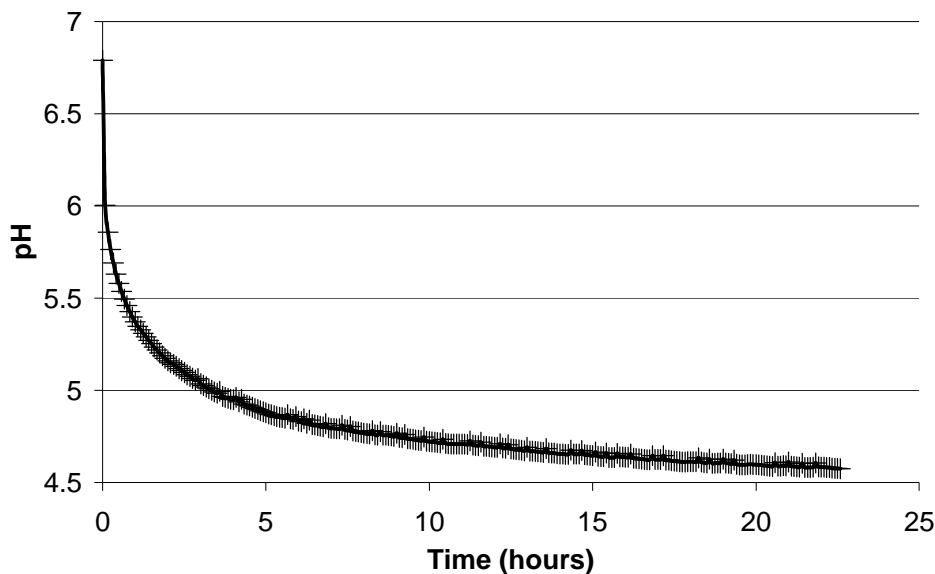


Figure 1. Example of curve representing the recorded values of pH as a function of time after the addition of GDL to a casein suspension maintained at 20°C. The solid line represents fitting of the data obtained by Table Curve.

Dynamic rheological measurements. The viscoelastic properties of both gels were studied with a controlled stress rheometer (Rheostress RS150, Haake, Germany) using a double gap cylinder sensor (DG41). The temperature was maintained at 20°C and the surface of the sample was covered with silicone oil to prevent evaporation. The storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were recorded at a frequency of 1 Hz and the rheometer was programmed to adjust the stress automatically to provide a strain of 0.5%, which was found to be within the linear viscoelastic region of the samples. The phase angle (δ) was calculated according to the equation: $\delta = \tan^{-1}(G''/G')$.

Puncture tests. Penetration measurements were performed with an Instron Universal Testing Machine 5500 (Instron Ltd., France) monitored by the Merlin software. A flat end puncture probe with a diameter of 12.5 mm was pushed into the sample at a speed of 100 mm/min. The depth of penetration into the sample was 8 mm and the data sampling rate was 50 points per second. The stiffness (slope of the linear part of the curve, representing the elastic deformation, N/mm) and the hardness (strength at the ultimate depth, N) or the strength at fracture (N) when it occurred, were calculated.

Scanning electron microscopy (SEM). Images were obtained with a scanning electron microscope (Jeol JSM 6301F) operating at an acceleration voltage of 9 kV. The images were

produced by CMEBA (France, Rennes). The detailed protocol concerning sample preparation was previously given in ref ²⁵.

Self-Diffusion Measurements. All measurements were conducted at $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and the series of diffusion coefficients during the coagulation processes were obtained according to the procedure described in ref ²⁵.

Water self-diffusion was measured on a 20 MHz Bruker spectrometer equipped with a field gradient probe with a spin echo sequence (PFG-SE). The NMR tubes had an internal diameter of 8 mm, and calibration of the strength of gradients was performed with a sample of pure water of a known self-diffusion coefficient at 20°C ($D_{\text{H}_2\text{O}} = 1.98 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Ten values of gradient strength (g) ranging between 0.6 and 3.2 T/m were used during each measurement. Four scans were carried out and the recycle delay was set at five T_1 . The gradient length (δ) and the diffusion interval (Δ) were 0.5 and 5.0 ms, respectively.

PEG Self-Diffusion measurements were performed on a 500 MHz Bruker spectrometer equipped with a field gradient probe with 5 mm NMR tubes. Diffusion spectra were acquired with a stimulated echo sequence using bipolar gradients (STE-BP) and a 3-9-19 WATERGATE pulse scheme to suppress the water signal. Experiments were carried out with 16 different values of g , ranging from ~ 0.25 to 5.00 T/m, with $\delta = 1.0$ ms, 16 scans and the recycle delay was set at 3 T_1 . Depending on the molecular weight of the PEG studied, Δ was adjusted to obtain a diffusion distance $z \sim 1.5 \mu\text{m}$ in the casein suspension, in accordance with the Einstein equation $z = (2 D_{\text{PEG}} \Delta)^{1/2}$. This procedure enabled molecular probes to cover a much greater distance than the casein micelle diameter (diameter around 150 nm^{30}).

NMR processing methods. All the data processing was performed with Matlab software. Monte-Carlo simulations were used for error calculations with 200 iterations. All self-diffusion coefficients were calculated from the following equation:

$$I / I_0 = \sum_i p_i \exp(-k D_i) \quad (1)$$

where I_0 is the signal intensity in the absence of gradients, D_i the self-diffusion coefficient of the i th component, p_i the fractional proton number of the i th component, and $\sum p_i = 1$ (in this study, i was one or two). The values taken by k in a classic spin echo sequence (as for water self-diffusion measurements) are given by the following equation:

$$k = \gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta \quad (2)$$

However, in a STE-BP NMR sequence with a WATERGATE scheme (as for PEG self-diffusion measurements) the equation is transformed into:

$$k = \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3 - \tau/2) \quad (3)$$

Here, γ is the gyromagnetic ratio (for protons, $\gamma = 26.7520 \times 10^7 \text{ rad.T}^{-1}.\text{s}^{-1}$), g the amplitude of the gradient, δ gradient duration, Δ the time between the leading edges of gradients and τ the time between the end of each gradient and the next radiofrequency pulse.

The self-diffusion coefficients of PEGs in the suspensions and all those obtained for water were calculated by fitting **eq. 1**, with $i = 1$, to the raw NMR data. However, the gluconic acid which is progressively formed by hydrolysis of GDL presented an overlapping signal with those of PEGs at a shift of ~ 3.6 ppm. For the 96750 g/mol PEG, this polluting signal was totally attenuated in the fourth spectrum of the diffusion spectra. The results for this polymer in the presence of gluconic acid were therefore determined by fitting **eq. 1**, with $i = 1$, after eliminating the first three intensities.

However, the diffusion coefficient of the 620 g/mol PEG was close enough to that of the gluconic acid (180 g/mol) to render the separation of each component by a bi-exponential fit ineffective, i.e. **eq. 1** with $i = 2$. To overcome this problem, the diffusion coefficient of the gluconic acid was always determined from an isolated and specific peak of the latter. The proportion of this polluting signal contributing to the NMR band of interest was then estimated. For the first PEG diffusion value measured in the presence of gluconic acid, i.e. at pH ~ 6 , the proportion of the gluconic acid signal was obtained by taking an isolated casein signal as reference. For subsequent values, since the sample remained in the tube inside the NMR spectrometer, the increasing proportion of gluconic acid polluting the PEG signal was estimated according to the evolution of the total signal area (PEG + gluconic acid) in the absence of gradients. The diffusion coefficient of gluconic acid and its fractional proton number were finally reintroduced in **eq. 1** with $i = 2$ to determine the diffusion coefficient of the small polymer.

Normalization of the self-diffusion coefficients. The self-diffusion coefficients obtained in casein suspensions and gels cannot be directly compared because the hindrance caused by the addition of GDL must be considered. This effect was previously investigated in D₂O solutions

and it was shown that the reduction in the probe diffusion rate was proportionally the same whatever the PEG molecular weight¹¹. The effect of the addition of GDL was thus explained by an increase in bulk viscosity. In H₂O, this caused exactly the same hindrance as that observed in D₂O (data not shown). For all the molecules studied, the self-diffusion coefficients obtained after the addition of GDL were thus corrected according to the equation previously described in ref¹¹:

$$D_{\text{corrected}} = D_{\text{measured}} + 0.0235 \times [\text{GDL}]$$

where [GDL] is the mass of GDL added, expresses as a percentage of the total sample mass.

RESULTS

Characterization of acid-induced coagulation. The storage modulus (G'), the loss modulus (G'') and the phase angle (δ) recorded during the acidification of a concentrated casein suspension are given in **Figure 2** as a function of pH for two repetitions. Not too much importance should be attached to the differences between the two repetitions before the sol-gel transition (i.e. above pH = 4.65) because the values of G' and G'' measured were still very low (less than 1 Pa), and hence imprecise. The pH at onset of gelation, defined as the pH at which G' and G'' were equal, was $\text{pH}_{\text{gel}} = 4.60$, which corresponded to a time after the addition of GDL $t_{\text{gel}} = 20$ h 35. Beyond pH = 4.55, G' and G'' continued to increase while δ stabilized at 13° . Note that a plateau was really observed since the phase angle remained stable for several hours before we stopped the experiment.

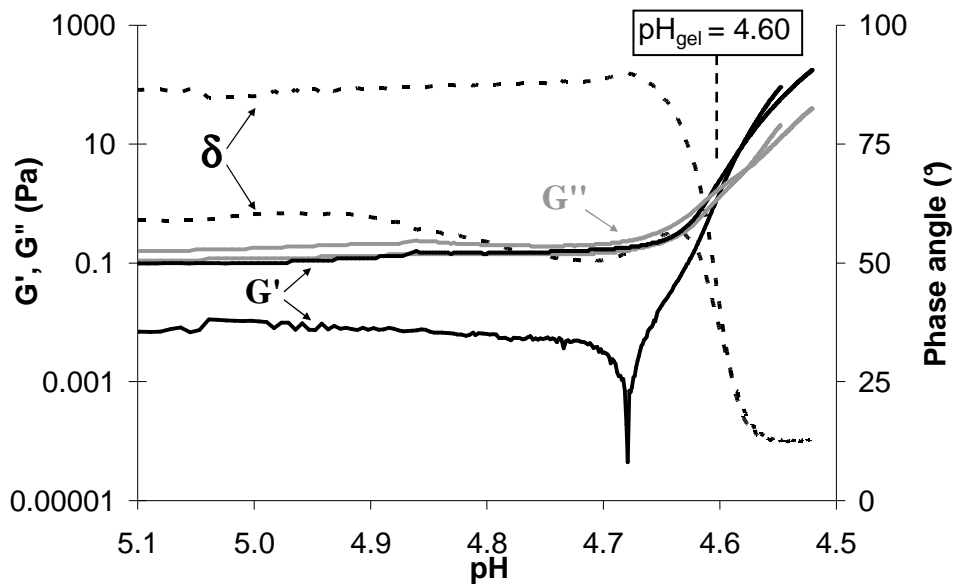


Figure 2. Evolution of storage modulus (G'), loss modulus (G'') and phase angle (δ) as a function of pH during acid coagulation (two repetitions).

In the hours after the onset of gelation, the gel was not solid enough to produce SEM images or to conduct stiffness measurements. These experiments were therefore performed only at around $t = 48$ h whereas the pH of the sample was stabilized just above 4.5. As can be observed in **Table 1**, the hardness and the stiffness values measured were very low and increased very slowly with time, in accordance with our macroscopic observations. At this moment, the gel structure consisted of an assembly of small and spherical particles (**Figure 3**).

Although these particles were necessarily connected since a gel was formed, no fusion between them was observed.

Time after addition of GDL	Stiffness (N/mm)	Hardness (N)
41 h 53	0.018	0.17
44 h 41	0.025	0.23
47 h 56	0.032	0.26
49 h 10	0.033	0.26

Table 1. Textural properties of the acid gel at different times after the addition of GDL at 20°C. The pH was approximately 4.5 at all times.

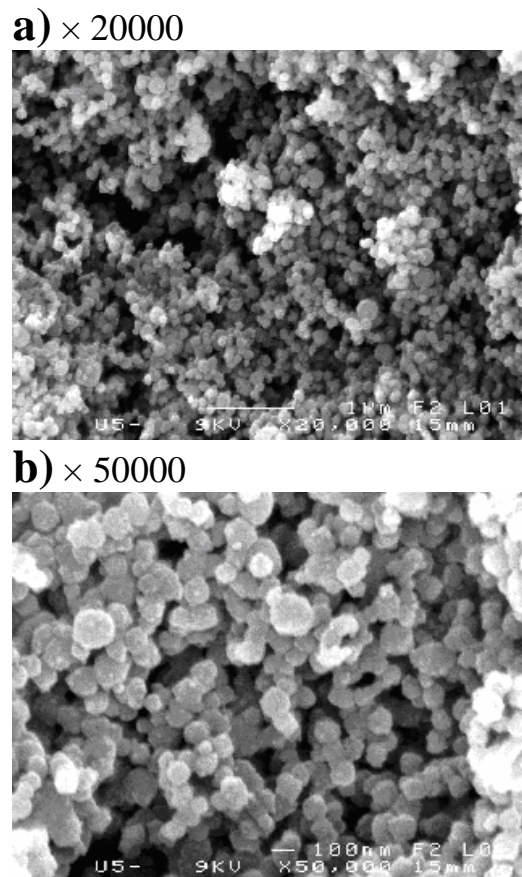


Figure 3. SEM images of an acid gel at $t = 48$ h (pH ~ 4.5) at two magnifications: a) $\times 20000$ and b) $\times 50000$.

Self-diffusion during acid-induced coagulation. Above pH = 4.7, although the rheological properties of the sample remained stable, wide variations in the self-diffusion coefficients of both PEGs and water occurred, as illustrated in **Figure 4** and **Figure 5**, respectively.

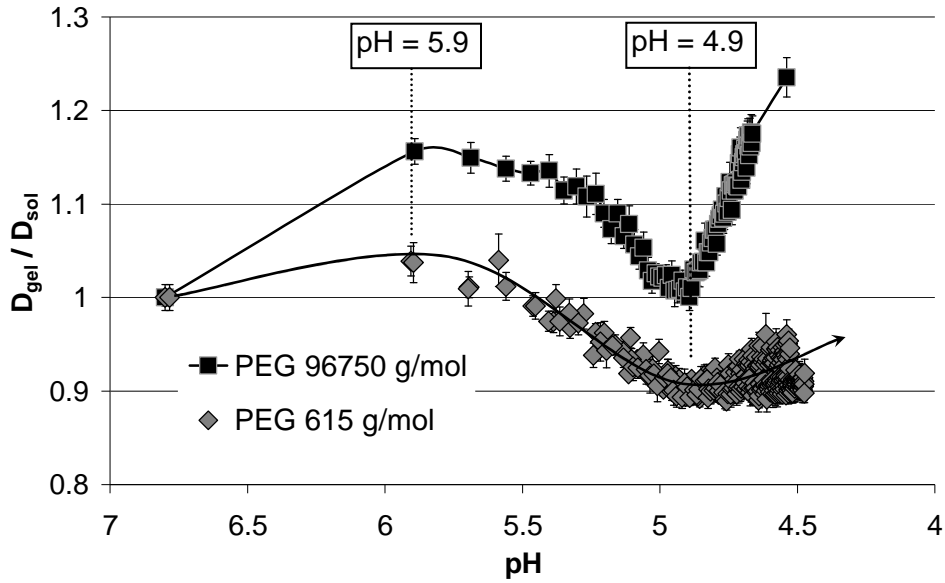


Figure 4. Evolution of self-diffusion coefficients of the 96750 g/mol PEG and the 620 g/mol PEG (two repetitions) as a function of pH during acid coagulation. Error bars represent the uncertainties given by the Monte-Carlo simulations and solid lines are guides for the eyes.

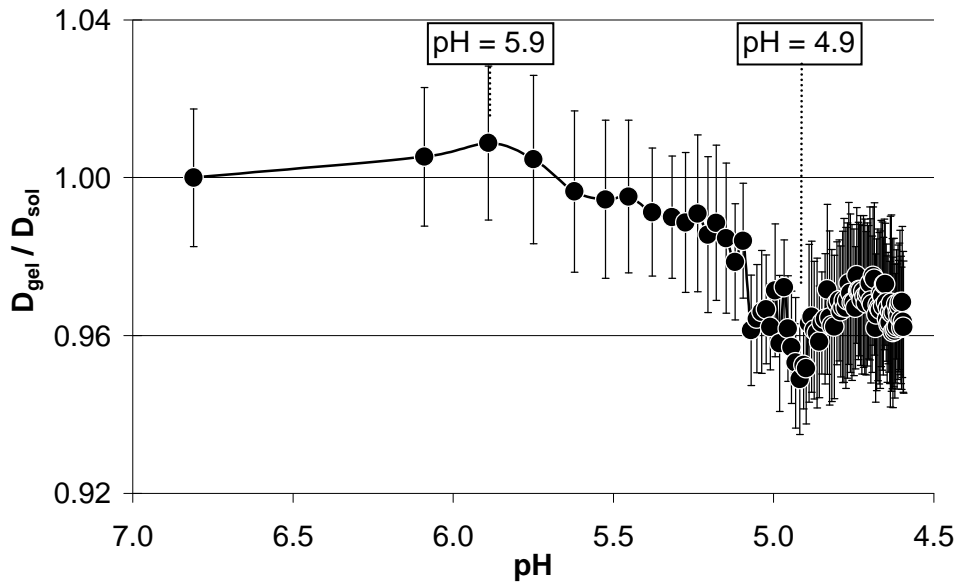


Figure 5. Evolution of self-diffusion coefficient of H_2O as a function of pH during acid coagulation. Error bars represent the uncertainties given by the Monte-Carlo simulations and the solid line is a guide for the eyes.

All curves could be broken down into three different phases. Between the initial pH and pH ~ 5.9 , the diffusion coefficients of the PEGs were enhanced, whereas that of water should be considered stable since the apparent increase was not significant. Below pH ~ 5.9 , the diffusion rate of all molecules then decreased until pH = 4.9 was reached. They increased

to different extents thereafter until the end of the experiments (at pH ~ 4.55). Nevertheless, depending on the size of the diffusing molecule, two differences emerged, indicating that scaling effects must be considered. First, in agreement with previous findings^{10,11,25}, the extent of the variations was greater for larger probes. Second, the relative size of the decrease, i.e. the second phase, was proportionally larger for smaller molecules. As a result, the diffusion of the largest PEG was increased overall in contrast to that of water and the small PEG. It should also be noted that the diffusion of gluconic acid (180 g/mol) followed the same evolution as that observed for the 620 g/mol PEG (data not shown).

The results obtained for the largest PEG are in line with a previous study in which diffusion measurements were performed before and after acid coagulation in D₂O systems¹¹. For water^{11,31} and a small probe such as the 620 g/mol PEG¹¹, the impact of the acid coagulation was previously considered to be negligible. In fact, our findings confirm that the initial and final values are very close, but they also show that the decrease in pH does have an influence on the diffusion of these molecules. Moreover, the present results demonstrate that the sol-gel transition is not the phenomenon explaining the impact of coagulation on probe diffusion. Other modifications of the matrix, to which rheological measurements were not sensitive, need therefore to be considered.

Characterization of combined coagulation. When rennet was added, the onset of gelation (characterized by pH_{gel} = 5.53 and t_{gel} = 50 min) took place much more rapidly because of the action of chymosin (**Figure 6**). After the end of the sol-gel transition (from pH ~ 5.4), while δ was stable around 16°, G' and G'' continued to increase, indicating that the gel became stiffer. In addition, G'' , and to a greater extent G' , increased more rapidly causing a second fall in the phase angle from pH ~ 4.9 (**Figure 6**) and a more rapid increase in gel stiffness, as shown in **Figure 7**. All these elements demonstrate that significant changes occurred in the structural organization of the sample after pH = 4.9. The nature and the number and/or strength of the binding forces necessarily changed during this interval. When the experiment was stopped (at t = 16 h 25 and pH = 4.67), the phase angle had reached a value of 5.8°, indicating that the gel had become very elastic. Note that all these rheological findings are in very good agreement with previous studies performed on combined gels^{32,33}.

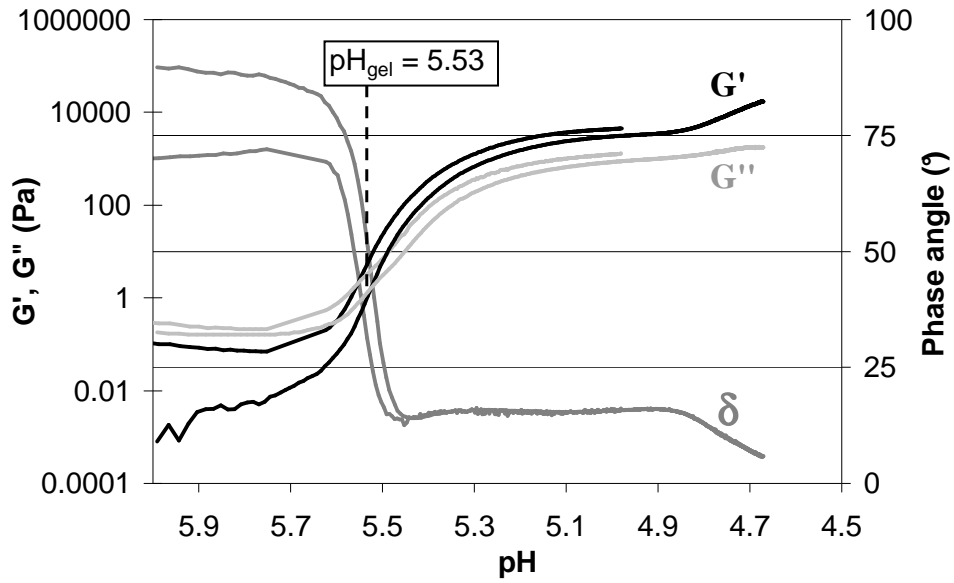


Figure 6. Evolution of storage modulus (G'), loss modulus (G'') and phase angle (δ) as a function of pH during combined coagulation (two repetitions).

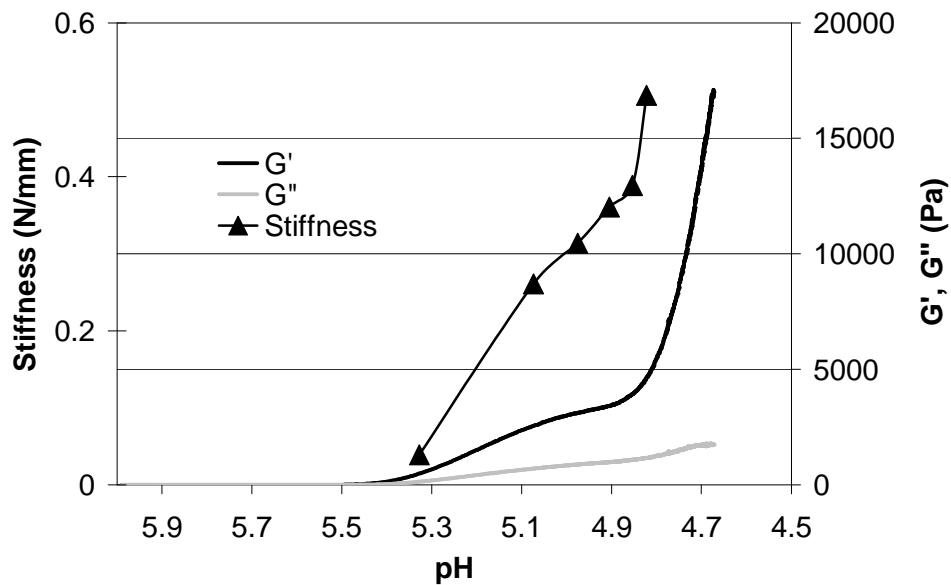


Figure 7. Evolution of storage modulus (G'), loss modulus (G'') and stiffness as a function of pH during combined coagulation.

SEM images obtained at different times after gel formation are presented in **Figure 8**. As can be seen from **Figure 8-a, 8-c** and **8-e**, the gel microstructure appeared homogeneous at a length scale of a few micrometers at all pH. **Figure 8-a** and **8-b** show a very similar network structure after gel formation (pH = 5.15) to that observed in the acid gel, i.e. small spherical particles and small pores. The matrix organization had greatly changed at pH = 4.78 (**Figure 8-c** and **8-d**). The microstructure appeared much more branched, with larger pores. The

network consisted of large casein aggregates and thick strands, indicating that the small particles had fused together. After 24 hours (pH = 4.56), the same type of organization was observed but with larger empty spaces, indicating that the gel structure had continued to evolve (**Figure 8-e** and **8-f**). Images during the hours following network establishment revealed that a new type of organization was being formed, progressively evolving toward a more “open” microstructure.

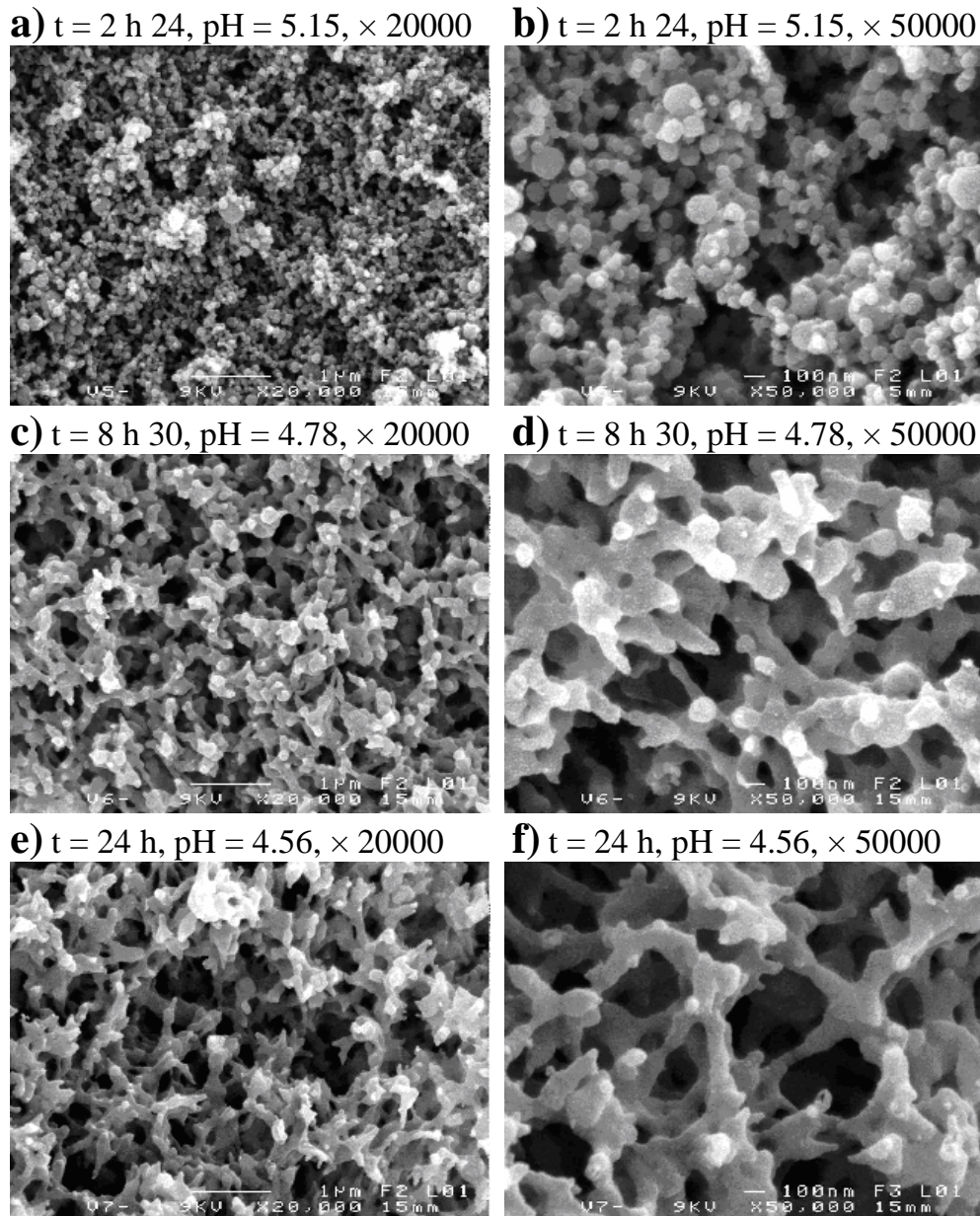


Figure 8. SEM images of combined gels at two magnifications ($\times 20000$ and $\times 50000$) at different times after the addition of chymosin and GDL: a) and b) $t = 2$ h 24, pH = 5.15 c) and d) $t = 8$ h 30, pH = 4.78 and e) and f) $t = 24$ h, pH = 4.56.

Self-diffusion during combined coagulation. As shown in **Figure 9**, until pH = 5.27 was reached, the diffusion of the 96750 g/mol PEG did not depend on the coagulation process since the same behavior was observed when the suspension was acidified without addition of rennet. During this first phase, all variations can therefore be explained by pH effects.

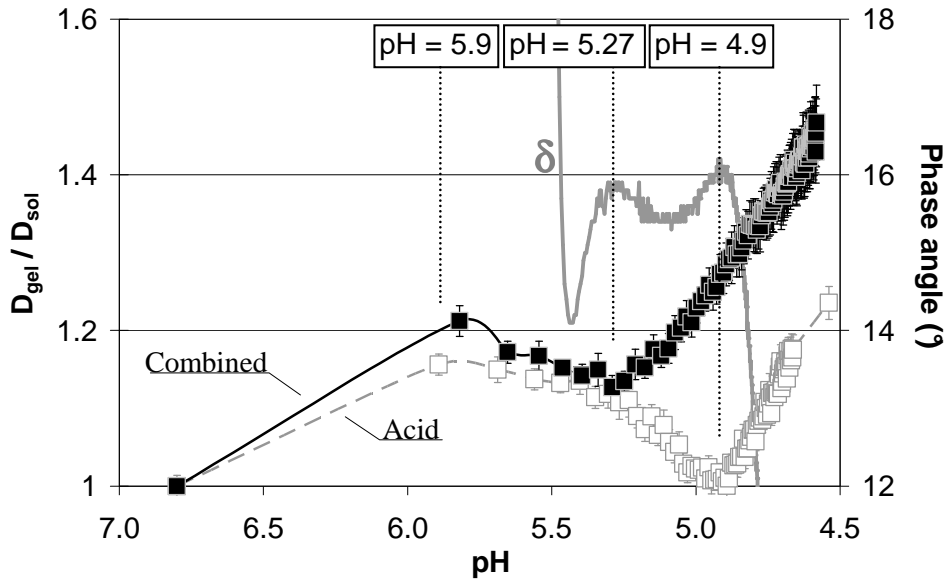


Figure 9. 96750 g/mol PEG self-diffusion coefficient as a function of pH with an enlargement of the evolution of the phase angle during combined coagulation. Diffusion of this probe during acid coagulation is also represented for comparison. Error bars represent the uncertainties given by the Monte-Carlo simulations and the black solid line and the dotted grey line are guides for the eyes.

However, in contrast to what was observed during acidification, a regular and sharp increase in the PEG diffusion rate occurred below pH = 5.27. During this second phase, the self-diffusion coefficient of the 96750 g/mol PEG was therefore strongly affected by the process used. Moreover, and as already observed during chymosin-induced coagulation²⁵, the moment at which the diffusion rate of this probe started to rise was concomitant with a small and local maximum in the phase angle after the end of the sol-gel transition (pH = 5.27). This result therefore confirms previous findings and the sensitivity of the 96750 g/mol PEG diffusion to phenomena taking place during the gel ageing phase. In contrast, the evolution of the 620 g/mol PEG diffusion during the combined coagulation and that obtained during acidification alone were almost identical (**Figure 10**). Acidification was thus clearly the main factor influencing the diffusion of this small probe while the chymosin action and the aggregation stage had only a minor influence.

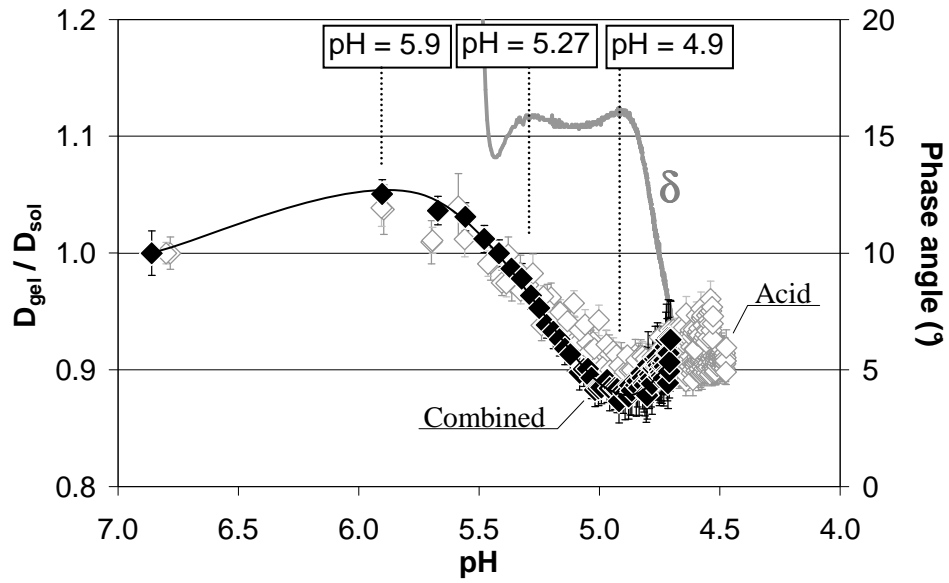


Figure 10. Enlargement of the evolution of the phase angle during combined coagulation, and the 620 g/mol PEG self-diffusion coefficient as a function of pH during both acid and combined coagulation processes. The solid black line is a guide for the eyes.

DISCUSSION

A casein micelle suspension consists of roughly spherical particles with a mean diameter around 150 nm³⁰ dispersed in water. The casein micelle structure is still a matter of debate but recent studies^{26,34-36} have shown that caseins are partly linked together by colloidal calcium phosphate nanoclusters, in agreement with the “open structure” models such as those proposed by Holt and Horne²⁸ and the dual-binding model of Horne³⁴. As observed experimentally, these models involve a more or less spherical, highly hydrated, and fairly open particle. In agreement with this description of casein micelles and their reported permeability to large molecules³⁷⁻⁴², it has been shown that, in contrast to water molecules and a 620 g/mol PEG, a 96750 g/mol PEG cannot or can hardly diffuse through casein particles²⁵. Moreover, the compaction of the casein network which takes place during the gel ageing phase of enzymatic-induced coagulation^{43,44} was found to cause an increase in the diffusion rate of a 96750 g/mol PEG but a reduction in that of a 620 g/mol PEG. The diffusion of the large polymer therefore appeared to be mainly sensitive to changes in the gel porosity whereas that of the small probe seemed to be mainly influenced by changes in the internal structure of the network. With these previous findings on probe diffusion in dairy matrices, and existing knowledge concerning coagulation processes, it is possible to propose an explanation for our diffusion results.

1. Self-diffusion during acidification. In the case of enzyme-induced coagulation, the diffusion rate of different PEGs did not vary before the network formation was completed²⁵. This could be explained simply since no great changes are thought to occur in the sample microstructure before gelation. However, during acidification the diffusion of all the molecules investigated was modified before the sol-gel transition (**Figure 4** and **Figure 5**) and several important physicochemical changes are known to take place in the sample. The overall charge of casein particles, their protein and mineral composition and their water content, often referred as their hydration, are all modified non-linearly upon acidification⁴⁵⁻⁴⁷. All these phenomena reflect or cause changes in the sample structure, and are often broken down into different phases which precisely match with those observed in our diffusion results. Depending on the pH range being considered and the diffusing molecule size, it is thus possible to relate our diffusion findings to structural modifications occurring at different length scales.

From the initial pH to 5.9, the most remarkable event taking place is a progressive decrease in the casein particle hydration, which reaches a minimum at pH ~ 5.9. At this pH value, about 15%⁴⁵⁻⁴⁹ of the water contained by the colloidal particles has been released in the aqueous phase and this causes a reduction in the mean particle size as observed by diffusing wave spectroscopy experiments⁵⁰⁻⁵². In fact, as the pH decreases it progressively approaches the isoelectric pH of caseins (pH_i ~ 4.6⁴⁵⁻⁴⁹). This loss of solvent is therefore thought to result from enhanced electrostatic attraction between caseins, and in particular from the collapse of the κ -casein layer⁴⁵⁻⁵².

Since the 96750 g/mol PEG could not or could hardly diffuse through casein particles, the reduction in casein particle size can be viewed as a decrease in the volume occupied by obstructing elements. More space was thus accessible to this large polymer, and its diffusion coefficient consequently increased (**Figure 4**). For the 620 g/mol PEG, the increase was smaller but significant, indicating that its diffusion was also sensitive to the variations in particle hydration. In fact, since this small polymer may diffuse through casein particles, the particle compaction should at least partially balance the effects of the enhanced casein-free volume. This would explain the smaller amplitude of variations observed. When the diffusing molecule size was further decreased, it can be seen that molecular diffusion was progressively less influenced by variations in hydration since that of water was not significantly modified at pH = 5.9 (**Figure 5**). This is understandable when considering that, in agreement with previous studies^{9,31}, water molecules were so small that the obstruction effects they experience were principally caused by the proteins themselves and not or only slightly by the way they hold together.

From pH = 5.9 to 4.9, three main phenomena occur. First of all, solubilization of casein molecules occurs during this phase and reaches a maximum at pH ~ 5.5 at 20°C^{46,47,53}. Although this should at least affect the diffusion of the 96750 g/mol PEG, since there are fewer soluble proteins at pH ~ 4.9 than at pH = 5.9, such a phenomenon cannot explain the overall decreases observed in this pH range (**Figure 4** and **Figure 5**). Secondly, particle hydration is known to return progressively to about its initial value. The details of the mechanism explaining this swelling remain unclear but it is generally attributed to the solubilization of the colloidal calcium phosphate (CCP), which constitutes the third important event occurring in this pH range. In fact, the CCP, which contributes considerably to casein

micelle integrity^{46,47,54}, is progressively solubilized as soon as acidification is in progress, but process of this dissolution becomes faster below pH ~ 6.0, and at pH = 4.9 all the calcium phosphate has been transferred into the serum phase^{38,46,47,53,55}. This necessarily alters the cohesion of the supramolecular edifices, and casein particles therefore undergo structural reorganization which is thought to cause the particle swelling⁴⁷. Besides, although nothing particular was observed by rheometry around pH = 4.9 during acidification (**Figure 2**), the evolution of the physical properties of the fresh combined gel was clearly modified at pH = 4.9 (**Figure 7** and **Figure 9**). In fact, this only reflects the lower sensitivity of rheological experiments to structural changes occurring in a liquid than in a gel, especially for such highly concentrated samples.

As during the first phase, the increase in particle hydration seemed to be the key factor explaining the results we obtained with the 96750 g/mol PEG (**Figure 4**). The lowest hydration, determined by ultracentrifugation and pellet drying, is reported to occur around pH = 5.2^{46,47} rather than at pH = 4.9, but the accuracy of the method employed is debatable and several parameters may explain this shift. Indeed, the precise pH at which the acidification effects take place depends on numerous factors such as the acidification rate^{49,55,56}, the casein concentration^{46,57} and the composition of the aqueous phase^{47,58-60}. This shift towards lower pH values was moreover confirmed by the onset of gelation which occurred at pH_{gel} = 4.60 (**Figure 2**) in our experiments, whereas it is generally reported to take place at around pH = 4.8 in acidified skim milks^{46,53,61}.

As observed for the large PEG, the diffusion of water molecules and of the 620 g/mol PEG also decreased until pH = 4.90 was reached (**Figure 4** and **Figure 5**). However, according to the extent of these reductions, they can only be partially attributed to particle swelling since the relative proportions of the three phases no longer correspond to the evolution of particle hydration. The impact of the calcium phosphate itself on the diffusion of water and of the probes may have an influence, but this explanation alone seems to be insufficient to explain such degrees of reduction and their dependence on probe size. However, the structural reorganization of the casein particle can explain these reductions by considering that water molecules and the 620 g/mol PEG can less easily diffuse through colloidal particles as they became rearranged. Since native casein micelles are thought to have a fairly open structure, it would be not surprising that they evolved towards a less permeable structure upon the loss of CCP. This interpretation of the results obtained with the 620 g/mol

PEG is moreover consistent with findings reported Dalglish *et al.*⁵² on the basis of ultrasonic spectroscopy experiments.

Below pH = 4.9, the amount of water contained by the casein particles again sharply decreases because of neutralization of the general charge until the isoelectric pH of caseins is reached ($pH_i \sim 4.6$ ^{45-49,62}). As explained for above pH = 5.9, the reduction in particle hydration caused the diffusion of the molecules investigated to increase to different extents depending on their molecular size (**Figure 4** and **Figure 5**). Gelation of the system took place at pH = 4.6 (**Figure 2**) but no particular changes could be observed in the diffusion curves. In contrast to what the rheological data suggest (**Figure 2**), our diffusion results showed that acid coagulation should be viewed as a very progressive process, in accordance with the description of a gradually increasing tendency of particles to interact as the pH is reduced⁵². Although the following findings can be ascribed to certain processing parameters, this description was reinforced by our macroscopic observations, the SEM images (**Figure 3**) and the very low and slowly evolving stiffness (**Table 1**), which indicate that the network structure has not been subjected to extensive structural rearrangements.

2. Self-diffusion during combined coagulation and the implications. The 96750 g/mol PEG diffusion results obtained during combined coagulation can be easily understood because the effects caused by pH and the chymosin action were clearly separated (**Figure 9**). In the first part of the curve, i.e. above pH = 5.27, the results were totally explained by pH effects as the same curve was obtained during the acidification process. Then at pH = 5.27, while the gel formation with a strong “rennet character” was over, the PEG self-diffusion rate started to increase at the precise moment at which there was a small and local maximum in the phase angle (**Figure 9**). Below this pH, the PEG diffusion rate regularly increased until the end of the experiment. As during acid coagulation, this polymer was very sensitive to the progressive increase in the casein-free volume and to the formation of more linear diffusion pathways which accompanied the structural reorganization of the gel, as can be seen from the SEM images (**Figure 8**). Without considering pH effects, all these findings are in total agreement with the results previously reported during enzymatic coagulation. Since these new results confirm the effects of chymosin action, which were interpreted in detail in ref²⁵, it is beyond the scope of this paper to discuss these events further here.

The changes in the evolution of gel stiffness and elasticity from pH = 4.9 (**Figure 7** and **Figure 9**) proved that modifications took place inside the network resulting from the total solubilization of the CCP. This mineral loss might also be related to the extensive fusion of the particles forming the network at this point (**Figure 8-a** to **8-d**). However, since the results obtained below pH = 5.27 showed that the 96750 g/mol PEG diffusion was no longer significantly influenced by pH effects (**Figure 9**), the overall evolution of the network microstructure in terms of added porosity and tortuosity effects was mainly governed by other types of rearrangement process which are known to occur during the ageing phase of a chymosin-induced gel⁴⁴. This highlights the importance of considering and obtaining information on the appropriate length scale of the structural rearrangement processes when trying to relate them to certain properties of dairy products.

The first part of the curve, i.e. above pH = 5.27, is also interesting. We previously showed that transfer of the C-terminal extremities of the κ -caseins from the colloidal to the aqueous phase (due to chymosin action) had no effect on the diffusion of the 96750 g/mol PEG²⁵. In addition, we revealed in this study that the increase in the diffusion of this polymer around pH = 5.9 was caused by reduction in particle size, which is precisely attributed to the collapse of these protruding chains^{46-48,50,51}, though some authors remain cautious on this issue⁵². If this was the only explanation we would have expected to observe an attenuation and progressive disappearance of the increase in the diffusion rate of the polymer as the chymosin action took place. Since the results presented in **Figure 9** indicate that the size of the casein particles was only pH-dependent until a gel was totally formed (pH = 5.27, t = 50 min), i.e. when a significant part of the κ -caseins had been hydrolyzed (probably around 40-50%³³), our results suggest that the reduction in particle size observed at pH ~ 5.9 would more likely be the result of overall particle shrinkage rather than only a collapse of the κ -casein layer.

For the small PEG (**Figure 10**), the same curves were obtained during both the acid and the combined coagulation. The diffusion of the 620 g/mol PEG was thus not significantly influenced by the considerable differences in sample properties when acidified with or without the addition of chymosin, i.e. sample state (liquid or gel), number or strength of the attractive forces inside the network (see elasticity and stiffness values), sample microstructure at the scale observed in the SEM images or even the total colloidal volume (see the diffusion results obtained for the large PEG). Besides, it is of note that these different evolutions in particle

hydration during the two processes confirm the minor influence of particle volume on the diffusion of the small PEG.

According to previous results obtained during chymosin-induced coagulation²⁵, we would nevertheless have expected to observe a slight but progressive decrease in the diffusion of the 620 g/mol probe concomitantly with the network densification. Although the differences between the two curves are so small compared to experimental uncertainties that no conclusion can be drawn, such a phenomenon would be compatible with the apparently greater extent of the decrease between pH = 5.27 and 4.9 (**Figure 10**). However, below pH = 4.9, the opposite trend to that described during chymosin coagulation was observed, i.e. whereas a compaction and a stiffening of the casein network took place during ageing, the diffusion of the small PEG slightly increased rather than decreased. This implies that the internal structure of the gel with a strong rennet character was greatly modified upon acidification because of CCP solubilization. In terms of permeability to diffusing molecules, the internal structure of the combined network seemed therefore to be similar to that of the acidified casein particles. This is in line with the results of Tranchant *et al.*³³ reporting that combined gels which first consist of a gel with a strong rennet character evolved from pH ~ 5.0 towards a gel with a predominantly acid character.

CONCLUSIONS

Throughout both acid and combined coagulation processes, the diffusion of a 96750 g/mol PEG was very sensitive to variations in the size of the casein particle and in the appearance of the network, whereas those of water and of a 620 g/mol PEG were affected by changes in their internal microstructure. Many of the structural modifications occurring in the sample at different levels could thus be revealed, and interesting conclusions on several key points of the milk coagulation processes could be drawn. In addition, it is of note that the duration of diffusion measurements can be reduced and that the use of lactic bacteria instead of GDL seems to be feasible. Both of these modifications would allow the acquisition of more diffusion data at high pH values.

Our results also proved that probe diffusion and rheological experiments are highly complementary. As for rheometry, NMR experiments can be performed continuously on the same sample. This is a great advantage, especially when studying systems that do not react instantaneously to “disturbances” (e.g. acidification of a milk system^{63,64}). In addition, whereas rheology permits characterization of the macroscopic behavior of the sample, the diffusion of probes can be used to provide structural information on smaller scales with equal efficiency in both the liquid and gel states. Finally, it should be noted that, in contrast to most of the techniques commonly employed to characterize modification of a microstructure, probe diffusion is even more sensitive to structural changes when samples are concentrated.

All these features demonstrate that kinetic probe diffusion experiments are very valuable to study the coagulation of milk systems, and might also be used to investigate the coagulation of other systems (polyacrylamide⁶⁵⁻⁶⁷, alginate^{7,68} ...), and certain phenomena such as post-gelation changes⁶⁹.

Acknowledgements

The authors thank the Regional Council of Brittany and SOREDAB for financial support. We are grateful to Armel Guillermo and Arnaud Bondon for their help with NMR experiments and Joseph Le Lannic for assistance with the SEM experiments. We thank Jean-Michel Soulié, Sandrine Eliot-Godéreaux, Pascale Persenot and Fabien Gutter from SOREDAB for helpful discussions and assistance with the rheological experiments, and Minale Ouethrani for active participation in the rheological and SEM experiments.

REFERENCES

1. Trampel, R., J. Schiller, L. Naji, F. Stallmach, J. Kärger, and K. Arnold, *Self-diffusion of polymers in cartilage as studied by pulsed field gradient NMR*. Biophysical Chemistry, **2002**. 97: p. 251-260.
2. Stilbs, P., *Characterization mesoscale structure and phenomena in fluids using NMR*, in *Mesoscale Phenomena in Fluid Systems*. **2003**, American chemical society: Washington. p. 27-43.
3. Johansson, L., U. Shantze, and J.E. Lofroth, *Diffusion and interaction in gels and solutions. 2. Experimental results on the obstruction effect*. Macromolecules, **1991**. 24(22): p. 6019-6023.
4. Masaro, L., M. Ousalem, W.E. Baille, D. Lessard, and X.X. Zhu, *Self-diffusion studies of water and poly(ethylene glycol) in solutions and gels of selected hydrophilic polymers*. Macromolecules, **1999**. 32(13): p. 4375-4382.
5. Matsukawa, S. and I. Ando, *A study of self-diffusion of molecules in polymer gel by pulsed-gradient spin-echo ¹H NMR*. Macromolecules, **1996**. 29: p. 7136-7140.
6. Nyden, M., O. Soderman, and G. Karlstrom, *A PFG NMR self-diffusion investigation of probe diffusion in an ethyl(hydroxyethyl)cellulose matrix*. Macromolecules, **1999**. 32(1): p. 127-135.
7. Baldursdottir, S.G., A.-L. Kjoniksen, and B. Nystrom, *The effect of riboflavin-photoinduced degradation of alginate matrices on the diffusion of poly(oxyethylene) probes in the polymer network*. European Polymer Journal, **2006**. 42(11): p. 3050-3058.
8. Croguennoc, P., T. Nicolai, M.E. Kuil, and J.G. Hollander, *Self-diffusion of native proteins and dextran in heat-set globular protein gels*. Journal of Physical Chemistry B, **2001**. 105(24): p. 5782-5788.
9. Colsenet, R., M. Cambert, and F. Mariette, *NMR relaxation and water self-diffusion studies in whey protein solutions and gels*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**. 53: p. 6784-6790.

10. Colsenet, R., O. Soderman, and F. Mariette, *Effect of casein concentration in suspensions and gels on poly(ethylene glycol)s NMR self-diffusion measurements*. *Macromolecules*, **2005**. 38(22): p. 9171-9179.
11. Le Feunteun, S. and F. Mariette, *Impact of casein gel microstructure on self-diffusion coefficient of molecular probes measured by 1H PFG-NMR*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**. submitted.
12. Newling, B., *Pulsed field gradient NMR study of the diffusion of H₂O and polyethylene glycol polymers in the supramolecular structure of wet cotton*. *Journal of Physical Chemistry B*, **2003**. 107: p. 12391-12397.
13. Weng, L.H., S.M. Liang, L. Zhang, X.M. Zhang, and J. Xu, *Transport of glucose and poly(ethylene glycol)s in agarose gels studied by the refractive index method*. *Macromolecules*, **2005**. 38(12): p. 5236-5242.
14. Price, W.S., *Pulsed field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part I. Basic theory*. *Concepts in Magnetic Resonance*, **1997**. 9: p. 299-336.
15. Price, W.S., *Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part II. Experimental aspects*. *Concepts in Magnetic Resonance*, **1998**. 10: p. 197-237.
16. Atha, D.H. and K.C. Ingham, *Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols*. *Journal of Biological Chemistry*, **1981**(23): p. 12108-12117.
17. Bhat, R. and S.N. Timasheff, *Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols*. *Protein Science*, **1992**. 1(9): p. 1133-1143.
18. Hancock, T.J. and J.T. Hsu, *Thermal stability studies of a globular protein in aqueous poly(ethylene glycol) by H-1 NMR*. *Biotechnology and Bioengineering*, **1996**. 51(4): p. 410-421.
19. Hermans, J., *Excluded-volume theorie of polymer-protein interactions based on polymer chain statistics*. *Journal of Physical Chemistry*, **1982**. 77: p. 2193-2203.
20. Knoll, D. and J. Hermans, *Polymer-protein interactions*. *Journal of Biological Chemistry*, **1983**. 258: p. 5710-5715.

21. Momot, K.I. and P.W. Kuchel, *PGF NMR diffusion experiments for complex systems*. Concepts in Magnetic Resonance Part A, **2006**. 28A(4): p. 249-269.
22. Dalvit, C., S.Y. Ko, and J.M. Bohlen, *Single and multiple-selective excitation combined with pulsed field gradients*. Journal of Magnetic Resonance Series B, **1996**. 110(2): p. 124-131.
23. Hwang, T.L. and A.J. Shaka, *Water suppression that works - Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients*. Journal of Magnetic Resonance Series A, **1995**. 112(2): p. 275-279.
24. Price, W.S., F. Elwinger, C. Vigouroux, and P. Stilbs, *PGSE-WATERGATE, a new tool for NMR diffusion-based studies of ligand-macromolecule binding*. Magnetic Resonance in Chemistry, **2002**. 40(6): p. 391-395.
25. Le Feunteun, S. and F. Mariette, *PGF-NMR techniques provide a new tool for continuous investigation of the evolution of the casein gel microstructure after renneting*. Macromolecules, **2007**. submitted.
26. Lucey, J.A., *Formation and physical properties of milk protein gels*. Journal of Dairy Science, **2002**. 85(2): p. 281-294.
27. Walstra, P., *On the stability of casein micelles*. Journal of Dairy Science, **1990**. 73: p. 1968-1979.
28. Holt, C. and D.S. Horne, *The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1996**. 50(2): p. 85-111.
29. Van Vliet, T., C.M.M. Lakemond, and R.W. Visschers, *Rheology and structure of milk protein gels*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2004**. 9(5): p. 298-304.
30. McMahon, D.J. and R.J. Brown, *Composition, structure, and integrity of casein micelles: A review*. Journal of Dairy Science, **1984**. 67: p. 499-512.
31. Mariette, F., D. Topgaard, B. Jönsson, and O. Söderman, *¹H NMR diffusometry study of water in casein dispersion and gels*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2002**. 50(15): p. 4295-4302.
32. Noel, Y., N. Lehembre, A. Dulac, and M.C. Clavaud, *Comparaison des cinétiques de coagulation enzymatique et mixte du lait. Influence du calcium*. Lait, **1989**. 69: p. 479-490.

33. Tranchant, C.C., D.G. Dalgleish, and A.R. Hill, *Different coagulation behaviour of bacteriologically acidified and renneted milk: the importance of fine-tuning acid production and rennet action*. International Dairy Journal, **2001**. 11: p. 483-494.
34. Horne, D.S., *Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products*. International Dairy Journal, **1998**. 8(3): p. 171-177.
35. Marchin, S., J.L. Putaux, F. Pignon, and J. Leonil, *Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering*. Journal of Chemical Physics, **2007**. 126(4): Art. No. 045101.
36. Horne, D.S., *Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2003**. 213: p. 255-263.
37. Creamer, K., G.P. Berry, and O.E. Mills, *A study of the dissociation of beta-casein of the bovin casein micelle at low temperature*. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, **1997**. 12: p. 58.
38. Dalgleish, D.G. and J.R. Law, *pH-induced dissociation of bovine casein micelles. 2. mineral solubilization and its relation to casein release*. Journal of Dairy Research, **1989**. 56: p. 727-735.
39. De Kruif, C.G., R. Tuinier, C. Holt, P.A. Timmins, and H.S. Rollema, *Physicochemical study of kappa- and beta-casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase*. Langmuir, **2002**. 18(12): p. 4885-4891.
40. O'Connell, J.E. and C.G. De Kruif, *Beta-casein micelles; cross-linking with transglutaminase*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, **2003**. 216: p. 75-81.
41. Schorsch, C., H. Carrie, A.H. Clark, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 519-528.
42. Schorsch, C., H. Carrie, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 529-539.

43. Mellema, M., J.W.M. Heesakkers, J.H.J. van Opheusden, and T. van Vliet, *Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry*. *Langmuir*, **2000**. 16(17): p. 6847-6854.
44. Mellema, M., P. Walstra, J.H.J. Van Opheusden, and T. Van Vliet, *Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels*. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2002**. 98(1): p. 25-50.
45. Vetier, N., S. Banon, J.P. Ramet, and J. Hardy, *Casein micelle solvation and fractal structure of milk aggregates and gels*. *Lait*, **2000**. 80(2): p. 237-246.
46. Gastaldi, E., A. Lagaude, S. Marchesseau, and B.T. De la Fuente, *Acid milk gel formation as affected by total solids content*. *Journal of Food Science*, **1997**. 62(4): p. 671-675.
47. Famelart, M.H., F. Lapesant, F. Gaucheron, Y. Legraet, and P. Schuck, *pH-induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: Influence of aqueous phase*. *Lait*, **1996**. 76(5): p. 445-460.
48. Banon, S. and J. Hardy, *A colloidal approach of milk acidification by glucono-delta-lactone*. *Journal of Dairy Science*, **1992**. 75(4): p. 935-941.
49. Banon, S. and J. Hardy, *Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection*. *Journal of Dairy Research*, **1991**. 58: p. 75-84.
50. Alexander, M. and D.G. Dalgleish, *Application of transmission diffusing wave spectroscopy to the study of gelation of milk by acidification and rennet*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **2004**. 38: p. 83-90.
51. Alexander, M., M. Corredig, and D.G. Dalgleish, *Diffusing wave spectroscopy of gelling food systems: The importance of the photon transport mean free path (l^*) parameter*. *Food Hydrocolloids*, **2006**. 20: p. 325-331.
52. Dalgleish, D., M. Alexander, and M. Corredig, *Studies of the acid gelation of milk using ultrasonic spectroscopy and diffusing wave spectroscopy*. *Food Hydrocolloids*, **2004**. 18(5): p. 747-755.
53. Gastaldi, E., A. Lagaude, and B.T. De la Fuente, *Micellar transition state in casein between pH 5.5 and 5.0*. *Journal of Food Science*, **1996**. 61(1): p. 59-65.
54. Van Hooydonk, A.C.M., H.G. Hagedoorn, and I.J. Boerrigter, *pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneing. 1. effect of*

- acidification on physico-chemical properties*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1986**. 40: p. 281-296.
55. Lee, W.J. and J.A. Lucey, *Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature*. Journal of Dairy Science, **2004**. 87(10): p. 3153-3164.
56. Vetier, N., S. Desobry-Banon, M.M.O. Eleya, and J. Hardy, *Effect of temperature and acidification rate on the fractal dimension of acidified casein aggregates*. Journal of Dairy Science, **1997**. 80(12): p. 3161-3166.
57. Ozer, B.H., R. Stenning, A.S. Grandison, and R.K. Robinson, *Effect of protein concentration on the properties and structure of concentrated yogurts*. International Journal of Dairy Technology, **1999**. 52(4): p. 135-138.
58. Auty, M.A.E., B.T. O'Kennedy, P. Allan-Wojtas, and D.M. Mulvihill, *The application of microscopy and rheology to study the effect of milk salt concentration on the structure of acidified micellar casein systems*. Food Hydrocolloids, **2005**. 19(1): p. 101-109.
59. Schkoda, P., A. Hechler, and H.G. Kessler, *Effect of minerals and pH on rheological properties and syneresis of milk-based acid gels*. International Dairy Journal, **1999**. 9: p. 269-273.
60. Karlsson, A.O., R. Ipsen, K. Schrader, and Y. Ardo, *Relationship between physical properties of casein micelles and rheology of skim milk concentrate*. Journal of Dairy Science, **2005**. 88(11): p. 3784-3797.
61. Famelart, M.H., J. Tomazewski, M. Plot, and S. Pezennec, *Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein systems*. International Dairy Journal, **2004**. 14(4): p. 313-321.
62. Roefs, S.P.F.M., P. Walstra, D.G. Dalgleish, and D.S. Horne, *Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1985**. 39: p. 119-122.
63. Mariette, F. and P. Marchal, *NMR relaxation studies of dairy processes*. Journal of Magnetic Resonance Analysis, **1996**. 2(4): p. 290-296.
64. De Kruijff, C.G., *Skim Milk Acidification*. Journal of Colloid and Interface Science, **1997**. 185(1): p. 19-25.

65. Okay, O. and W. Oppermann, *Polyacrylamide-clay nanocomposite hydrogels: Rheological and light scattering characterization*. *Macromolecules*, **2007**. 40(9): p. 3378-3387.
66. Calvet, D., J.Y. Wong, and S. Giasson, *Rheological monitoring of polyacrylamide gelation: Importance of cross-link density and temperature*. *Macromolecules*, **2004**. 37(20): p. 7762-7771.
67. Gibbs, S.J. and C.S. Johnson, *Pulsed field gradient NMR study of probe motion in polyacrylamide gels*. *Macromolecules*, **1991**. 24: p. 6110-6113.
68. Baldursdottir, S.G. and A.L. Kjoniksen, *Rheological characterization and turbidity of riboflavin-photo sensitized changes in alginate/GDL systems*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2005**. 59(3): p. 501-510.
69. Pacios, I.E. and I.F. Pierola, *Importance of postgel reactions in determining the polymer network structure and properties. Poly(N-vinylimidazole) hydrogels*. *Macromolecules*, **2006**. 39(12): p. 4120-4127.

Chapitre VI

Discussion générale et
perspectives

1. Discussion générale

La propriété la plus caractéristique des micelles de caséines réside dans leur aptitude à former des gels par l'action protéolytique de la chymosine et/ou lorsque le milieu est acidifié. Les principaux changements de structure observés par rapport aux micelles de caséines en suspension sont :

- La formation d'un réseau, initialement constitué par les particules caséiques
- La fusion plus ou moins importante, selon les conditions, de ces particules pour former un réseau de plus en plus « lisse » et compact
- Une diminution de la voluminosité des agrégats caséiques

Colsenet *et al.*¹ avaient précédemment montré que les coefficients d'auto-diffusion normalisés des PEGs dans les suspensions et les gels de caséines étaient affectés par :

- La concentration en caséines. Plus elle était importante, plus la diffusion des PEGs était diminuée.
- La taille du PEG. Pour une concentration donnée, la diffusion des PEGs était d'autant plus réduite que leur taille était importante.
- Par l'état de la matrice, i.e. solution ou gel. La diffusion était favorisée après la coagulation présure. Cet effet était d'autant plus important que la taille du PEG était élevée.

Ces différents effets ont été expliqués sur la base d'un modèle d'obstruction faisant intervenir deux chemins de diffusion : autour et au travers des particules caséiques. Dans le cas des suspensions, ce modèle a permis d'expliquer à la fois les effets de la concentration et les effets liés à la taille des PEGs entre 1080 et 82500 g/mol. Au-delà, la diffusion au sein des particules caséiques ne semblait plus possible. Sur la base de ce modèle, les auteurs avaient de plus montré que l'augmentation de la diffusion après la formation du gel pouvait s'expliquer par une réduction de l'hydratation des agrégats caséiques, c'est-à-dire par l'augmentation de la porosité du réseau.

Les premières expériences réalisées durant ce projet avaient pour objectif d'étoffer ces premières conclusions. La gamme des masses moléculaires étudiée a été étendue, en mesurant la diffusion de PEGs de plus petite taille, dans le but de mettre en évidence un effet « seuil »

en dessous duquel la diffusion est indépendante de la structure. En parallèle, l'influence de coagulations faisant intervenir des mécanismes différents, et conduisant donc à des gels ayant des structures distinctes, a été étudiée (*chapitre III*).

1.1. Effet de la structure des gels sur la diffusion des PEGs

La diffusion de PEGs ayant des masses moléculaires entre 620 et 527000 g/mol a été étudiée dans des gels induits par une coagulation présure, acide et par une coagulation associant les deux mécanismes, i.e. la « coagulation mixte ». La **Figure 1** rassemble l'ensemble des résultats sous forme de rapports des coefficients de diffusion dans les gels normalisés par le coefficient de diffusion dans la suspension. Un rapport supérieur à 1 traduit donc une augmentation de la diffusion après gélification.

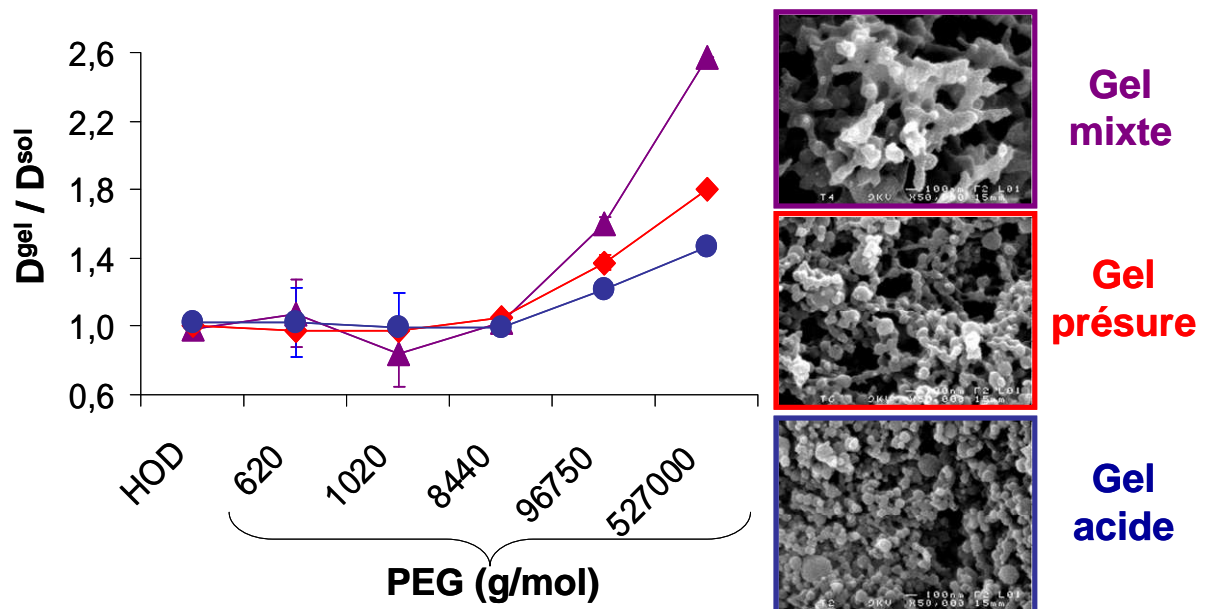


Figure 1 : Coefficients de diffusion de HOD et des différents PEGs après différents types de gélification normalisés par ceux obtenus avant ajout des agents gélifiants.

On remarque que pour une masse moléculaire inférieure ou égale à 8440 g/mol, la diffusion n'est pas significativement influencée par la structure des matrices (solution et gels) et le mode de formation des gels. Ceci suggère que l'agrégation des particules caséiques et les changements de structure des réseaux ne sont pas suffisants pour induire des modifications dans la diffusion de ces PEGs. Notons par ailleurs que ce résultat paraît être assez spécifique des systèmes caséiques puisque la diffusion des PEGs de petite taille est dépendante de la

structure des matrices à base de protéines sériques²⁻⁴, de protéines gastriques⁵ ou encore de polysaccharides⁶ (*chapitre I*).

Sur la base du modèle proposé par Mariette *et al.*⁷ pour la diffusion de l'eau et par Colsenet *et al.*¹ pour la diffusion des PEGs, ces résultats s'expliqueraient par la grande perméabilité des particules caséiques. Rappelons en effet que des espèces de taille importante, comme la transglutaminase (45000 g/mol)⁸⁻¹¹, peuvent entrer dans les micelles de caséines. Les PEGs de 8440 g/mol et moins sont donc, *a priori*, suffisamment petits pour diffuser au travers des particules et du réseau caséique. Pour conforter cette analyse, les rayons hydrodynamiques des PEGs ont été déterminés à partir de la relation de Stokes-Einstein :

$$R_h = \frac{k_B T}{D_0 \eta 6 \pi}$$

avec k_B la constante de Boltzmann, T la température (K), η la viscosité de l'eau, et D_0 le coefficient de diffusion d'une molécule infiniment diluée. Les rayons d'hydratation obtenus sont présentés dans la **Table 1** et ont été calculés à partir des valeurs des coefficients de diffusion des PEGs dans H₂O à 20°C.

PEG (g/mol)	D_0	Rh (nm)
620	2,68E-10	0,80
1020	1,99E-10	1,08
8440	6,62E-11	3,24
96750	1,61E-11	13,3
527000	5,76E-12	37,2

Table 1 : Rayons hydrodynamiques des PEGs calculés par la relation de Stokes-Einstein.

Il apparaît ainsi que les PEGs de 8440 g/mol et moins restent très petits devant la taille des micelles (rayon autour de 100 nm). Sachant que ces molécules sont aussi flexibles et peuvent entrer dans un régime de reptation (paragraphe 3.3 du *chapitre I*), il ne semble pas surprenant qu'elles puissent diffuser au travers des agrégats protéiques. En conséquence, l'accroissement de la porosité des gels devrait induire une augmentation des coefficients de diffusion des PEGs, mais dans le même temps, la réduction de la porosité interne aux agrégats caséiques devrait se traduire par une diminution de leur coefficient de diffusion. Les deux mécanismes étant fortement corrélés et conduisant à des effets antagonistes sur la diffusion, il est possible que globalement, aucun effet ne soit détecté.

Les coefficients de diffusion des PEGs de 96750 et 527000 g/mol sont très différents selon les matrices étudiées, et systématiquement accrue après gélification (**Figure 1**). L'effet le plus important est celui de la coagulation mixte. Par exemple, le coefficient de diffusion du PEG de 52700 g/mol dans le gel mixte est plus du double de celui déterminé en solution. La porosité des gels, estimée sur la base des images de microscopie électronique à balayage, semble être le paramètre clé pour expliquer ces effets : plus la porosité est grande, plus la diffusion de ces sondes est importante. Celle-ci étant connue pour augmenter, parfois grandement, au cours des processus de réarrangement du réseau caséique, ces résultats suggèrent que l'augmentation des coefficients de diffusion reflète, au moins en partie, l'intensité de ces phénomènes.

Il est également possible d'expliquer ces résultats sur la base du modèle proposant deux chemins de diffusion. Toutefois, à l'inverse de ce qui a été supposé pour les petits diffusants, il faut admettre que les PEGs de 96750 et 527000 g/mol ne peuvent pas, ou peuvent difficilement, diffuser au travers des particules caséiques. Remarquons que l'hypothèse inverse semble difficilement concevable compte-tenu des rayons hydrodynamiques de ces PEGs (**Table 1**). Les interstices entre les agrégats caséiques (i.e. les pores du réseau) seraient donc les seuls espaces dans lesquels ces sondes peuvent diffuser. Avec ces considérations, la relation entre la diffusion des PEGs de grande taille et la porosité des gels s'explique très simplement : plus le gel est poreux, plus le volume accessible à ces sondes est grand et plus leur coefficient de diffusion est élevé.

Au cours de ces premières expériences, l'interprétation des phénomènes était basée sur les différences constatées entre la diffusion des PEGs avant et après coagulation du système. Cependant, les matrices caséiques subissent de nombreuses transformations entre ces deux états. Afin de mieux appréhender l'influence de la structure des particules et agrégats caséiques sur la diffusion des PEGs, nous avons donc élaboré un protocole permettant de réaliser des mesures au cours des processus de coagulation. Cette démarche a été employée pour les trois modalités de coagulation et pour deux sondes très différentes : le PEG de 620 g/mol ($R_h = 0,8$ nm) et le PEG à 96750 g/mol ($R_h = 13,3$ nm). De plus, un effort a été réalisé pour étudier des gels à base de H₂O dans le but de s'affranchir de l'eau deutériée et de s'appuyer plus sereinement sur les données de la littérature.

1.2. Evolution de la diffusion des PEGs au cours de la coagulation présure

La **Figure 2** synthétise les évolutions de la diffusion des PEGs et de la structure des gels par MEB au cours de la coagulation présure (*chapitre IV*). Suivant la taille des PEGs, deux comportements opposés sont mis en évidence.

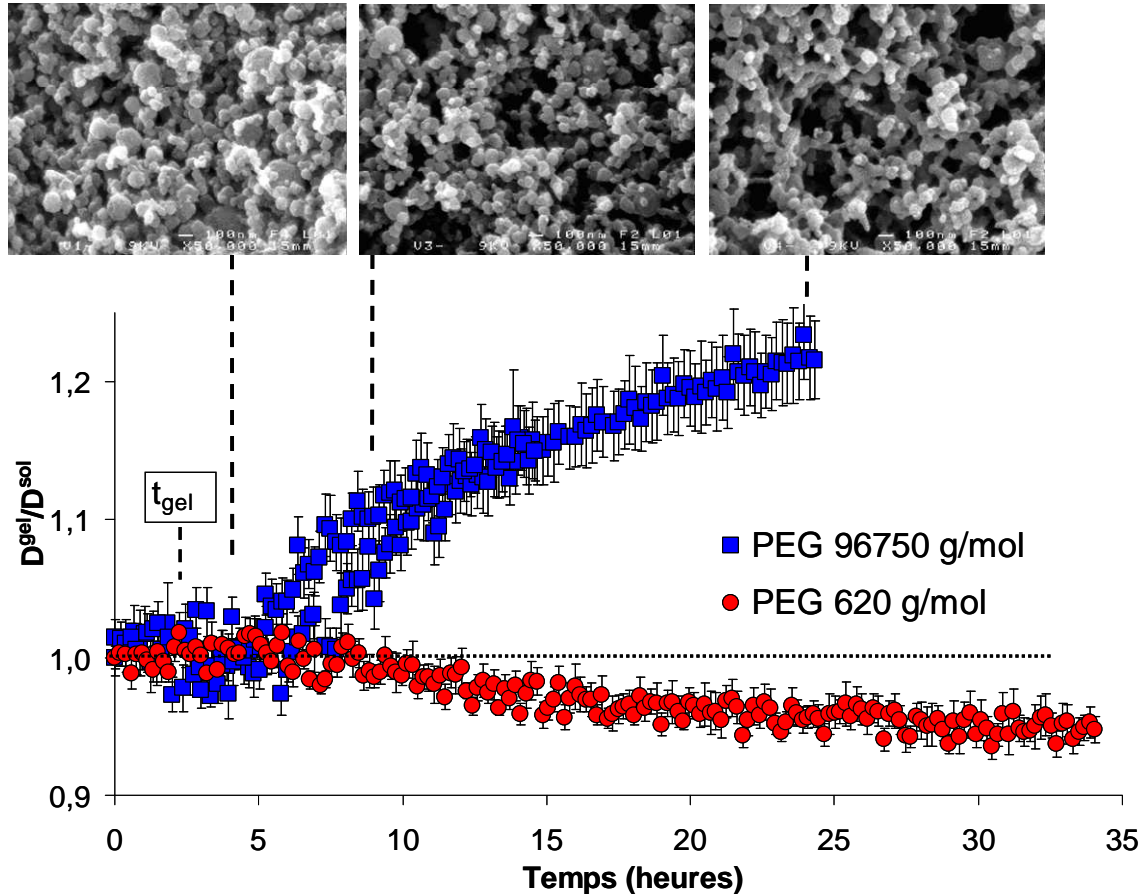


Figure 2 : Evolutions des coefficients de diffusion des PEGs 620 et 96750 g/mol et de la microstructure par MEB en fonction du temps après l'emprésurage.

Les deux premières étapes de la coagulation présure sont l'hydrolyse des caséines κ par la chymosine et l'établissement d'un gel. Le temps de gélification (t_{gel}) déterminé par rhéologie, et défini par $G' = G''$, était de 2 h 25 min. Toutefois, durant cette période, aucune modification de la diffusion n'est observée. Ceci démontre que les modifications induites par l'action de la chymosine et par la transition sol-gel n'ont pas d'influences significatives sur la diffusion des sondes. En revanche, au-delà de 5 heures, les coefficients de diffusion des PEGs évoluent de façon opposée. Une forte augmentation est observée dans le cas du PEG de 96750 g/mol, tandis que le coefficient de diffusion du petit PEG diminue faiblement. Ces résultats

démontrent ainsi que seuls les réarrangements du réseau, qui s'opèrent durant le vieillissement du gel, affectent la diffusion des sondes. Comme l'illustrent les images de MEB en **Figure 2**, la relation entre la porosité du système et la diffusion du PEG de 96750 g/mol est donc bien réelle. Par conséquent, ces résultats valident la prédominance du mécanisme de diffusion extra-micellaire pour les sondes de grande taille.

Soulignons que l'étude en cinétique apporte une meilleure sensibilité à l'étude des mécanismes de coagulation que l'étude à l'équilibre. En effet, si l'ensemble des résultats de diffusion sont cohérents entre les deux types d'expérience, les variations constatées en cinétique pour le petit PEG ne peuvent plus être considérées comme étant dans l'erreur expérimentale. En statique, une très légère réduction du coefficient de diffusion avait bien été observée pour les gels présure. Toutefois, celle-ci était tellement faible qu'il n'était pas possible d'attribuer ces variations au processus de coagulation (l'erreur de mesure ou une légère évaporation de l'eau aurait pu en être la raison). De plus, puisque la diffusion du PEG de 620 g/mol est réduite plutôt qu'augmentée, ces résultats confirment que cette molécule est bien capable de traverser les agrégats caséiques. En effet, la seule explication logique est que la contraction du réseau induit une réduction de la diffusion intra-agrégat telle, qu'elle prédomine sur l'augmentation de la diffusion extra-agrégat. La diffusion du PEG de 620 g/mol est donc plus sensible à la porosité interne des agrégats qu'à la porosité du gel.

Au-delà de la caractérisation des effets, ces résultats sont également très enrichissants puisqu'ils démontrent que la dynamique avec laquelle les réarrangements structuraux prennent place peut être caractérisée par des mesures de diffusion. Il existe en effet un réel manque de techniques permettant de caractériser cette phase de la coagulation de manière continue. Elle est pourtant essentielle pour mieux comprendre et appréhender les propriétés des gels et les phénomènes de synérèse (expulsion du sérum par contraction du gel). A notre connaissance, aucune autre méthode ne permet aujourd'hui de mesurer continuellement l'amplitude de ces phénomènes à ces échelles. L'approche développée dans cette étude semble donc être très complémentaire des techniques couramment employées pour caractériser leur effets, à savoir la rhéologie et la microscopie, et mieux adaptée que les méthodes invasives de perméamétrie qui sont parfois utilisées pour déterminer la perméabilité des gels¹²⁻¹⁶.

De plus, la complémentarité des mesures de diffusion par RMN avec la rhéométrie a permis de révéler que la contraction du réseau ne s'initie pas immédiatement après la formation du gel mais environ 5 h après emprésurage, soit 2 h 35 après le temps de gélification (**Figure 3**). Néanmoins, au moment où la diffusion des sondes commençait à être modifiée, l'angle de perte, qui reflète l'élasticité du gel, atteignait un maximum local.

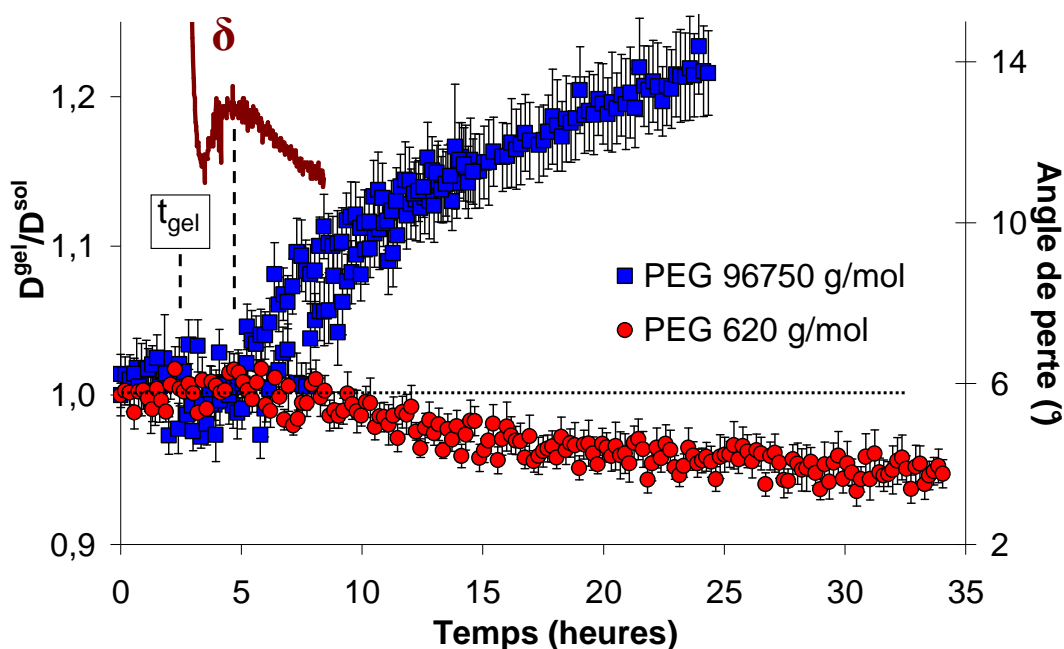


Figure 3 : Evolutions des coefficients de diffusion des PEGs 620 et 96750 g/mol et de l'angle de perte en fonction du temps après l'emprésurage.

Bien qu'une telle variation de l'angle de perte soit généralement difficile à expliquer, nos données suggèrent que ce léger changement peut être relié au début de la phase de contraction du réseau. Ensuite, l'accroissement de la porosité était associé à une légère et progressive augmentation de l'élasticité du gel et à une hausse régulière de la rigidité (*chapitre IV*).

En conclusion, ces résultats montrent qu'il existe deux échelles caractéristiques de structure à considérer pour expliquer la diffusion des sondes. Pour un PEG de taille importante la porosité du réseau est l'élément dominant, tandis que pour un PEG de petite taille, la porosité interne des agrégats est le facteur prépondérant. Néanmoins, avant la transition sol-gel, il est reconnu que la structure des particules caséiques n'est que peu

affectée par l'action de la présure. Aussi, nous avons choisi de confronter nos interprétations aux effets du pH qui sont connus pour modifier fortement la structure micellaire.

1.3. Evolution de la diffusion des PEGs au cours de la coagulation acide

1.3.1. Le PEG de 96750 g/mol

La **Figure 4** décrit les évolutions du coefficient de diffusion du PEG de 96750 g/mol et de l'angle de perte en fonction du pH. Contrairement à ce qui était observé pendant la coagulation présure, dans le cas de la coagulation acide, la diffusion de la sonde est modifiée avant la transition sol-gel qui est caractérisée par la chute de l'angle de perte.

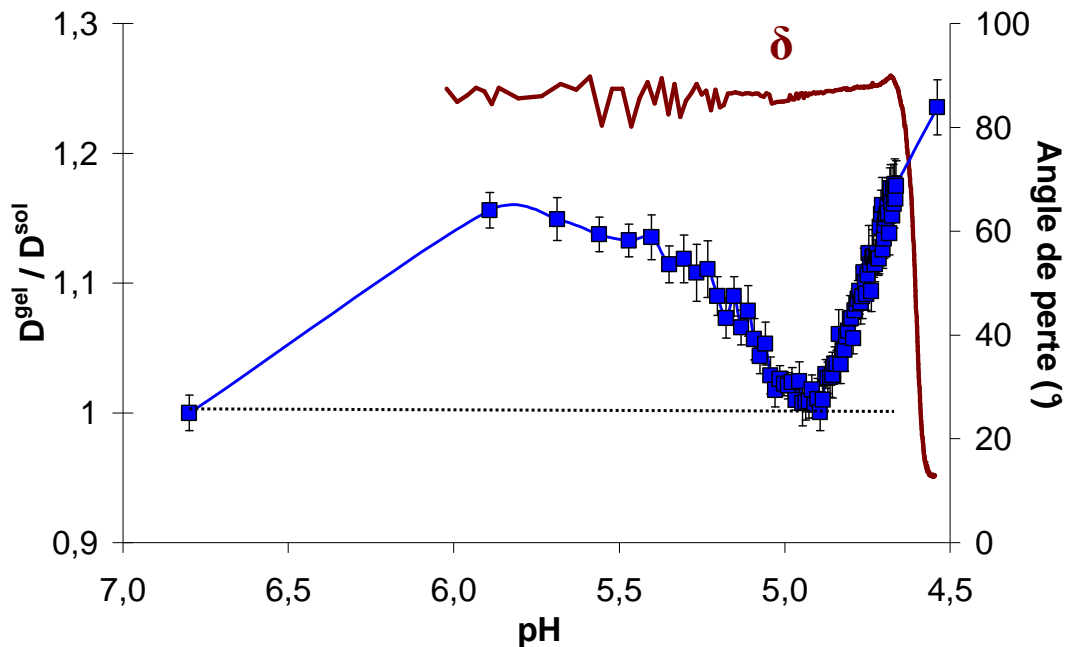


Figure 4 : Evolutions du coefficient de diffusion du PEG de 96750 g/mol et de l'angle de perte en fonction du pH au cours de la coagulation acide.

Suivant les valeurs de pH, les variations de la diffusion de cette sonde ont pu être entièrement expliquées par des changements d'hydratation, et donc de taille, des particules et/ou agrégats caséiques. Le coefficient de diffusion augmente lorsque la taille des particules diminue. En effet, les variations d'hydratation des micelles de caséines peuvent être décomposées comme suit :

- Du pH initial à pH ~ 5,9 : l'hydratation des particules caséiques est réduite d'environ 15 %¹⁷⁻²¹. Ce phénomène est généralement expliqué par une progressive neutralisation des

charges portées par les caséines (elles sont globalement chargées négativement au pH initial) ce qui conduirait à « l'aplatissement » de caséines κ en surface des micelles¹⁷⁻²⁴.

- De pH ~ 5,9 à pH ~ 4,9 : l'hydratation des particules caséiques augmente jusqu'à retrouver approximativement sa valeur initiale. Ce « gonflement » des particules est généralement attribué à la réorganisation progressive de la structure interne des particules caséiques. Bien que le phosphate de calcium colloïdal (PCC), qui constitue le squelette supposé de la structure micellaire, était progressivement relargué dans la phase aqueuse depuis le début de l'acidification, ce phénomène s'accélère en dessous de pH ~ 6,0. Autour de pH ~ 5,0, le PCC est complètement relargué^{18,20,25-27}. Néanmoins, les particules semblent garder leur intégrité jusqu'environ la fin de ce processus^{18,20,28}.

- De pH ~ 4,9 à pH ~ 4,6 : l'hydratation des particules est de nouveau réduite par l'intermédiaire d'attractions électrostatiques. En effet, la neutralisation globale des charges portées par les acides aminés des caséines s'opèrent progressivement puisque le pH isoélectrique des caséines se situe autour de pH = 4,60^{17-21,29}.

La diffusion du PEG 96750 g/mol est donc non seulement sensible à la porosité des gels mais aussi à la taille des particules colloïdales en solution. Les obstacles à considérer pour une telle sonde sont donc bien les particules caséiques, puis le réseau lorsqu'il est formé. Ces résultats sont très intéressants car il existe également un manque de technique permettant de suivre ces événements dans les matrices concentrées. Comme décrit dans le *chapitre I*, la plupart des techniques utilisées (microscopie électronique, viscosimétrie ou la centrifugation) ne sont pas adaptées au suivi des variations de l'hydratation au cours d'acidifications. Ce n'est pas le cas de la technique de diffusion multiple de la lumière (DWS), mais cette dernière ne peut pas être employée pour étudier des matrices concentrées. De plus, la diffusion des sondes n'est pas affectée par les phénomènes d'agrégation. Le suivi du volume occupé par les particules, les agrégats puis le réseau par des mesures de diffusion peut donc s'avérer être un outil précieux, notamment pour l'étude des matrices concentrées.

1.3.2. Le PEG de 620 g/mol

La **Figure 5** rassemble les évolutions des coefficients de diffusion du PEG de 620 g/mol et du PEG de 96750 g/mol au cours de la coagulation acide.

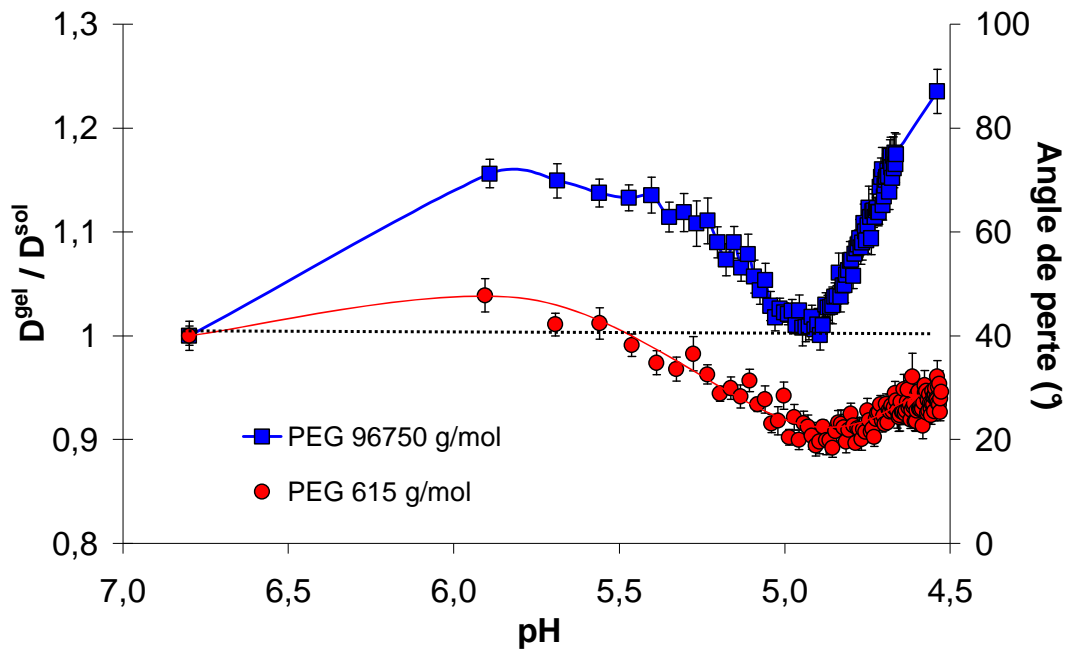


Figure 5 : Evolutions des coefficients de diffusion des PEGs 620 et 96750 g/mol en fonction du pH au cours de la coagulation acide.

Contrairement à la coagulation présure, qui entraînait un comportement spécifique du coefficient de diffusion de chaque PEG, dans le cas de la coagulation acide, nous retrouvons les mêmes profils d'évolution avec les mêmes valeurs caractéristiques de pH pour les deux sondes. Toutefois, il ne semble pas possible d'expliquer entièrement la diffusion du PEG de 620 g/mol sur la base des variations d'hydratation.

En effet, la réduction de la diffusion observée pour ce PEG entre les pH ~ 5,9 et 4,9 semble excessive pour être uniquement attribuée à ces phénomènes. En considérant que la diffusion du PEG de grande taille révèle les variations du volume occupé par la phase caséique, alors celui-ci devrait être identique en solution et à pH ~ 4,9 ($D^{\text{gel}}/D^{\text{sol}} = 1$). S'il était uniquement sensible à ce phénomène, le coefficient de diffusion normalisé du PEG de 620 g/mol aurait donc également dû être de 1 à pH ~ 4,9. Cette forte réduction suggère ainsi que la réorganisation de la structure interne des particules caséiques, qui s'opère lorsque le phosphate de calcium colloïdal se solubilise, affecte aussi la diffusion de cette sonde. Ensuite, dans la mesure où les agrégats caséiques n'ont plus la même structure interne que dans le cas des gels présure, l'augmentation de la diffusion du PEG de 620 g/mol durant leur contraction

n'est pas inconcevable. Par ailleurs, cela montre que l'augmentation de la diffusion extra-particule peut avoir un effet plus important que la réduction de la diffusion intra-particule

Soulignons encore une fois que la diffusion du PEG de petite taille s'est avérée être sensible à des effets de structure, tandis que rien n'avait pu être révélé dans les expériences menées à l'équilibre à cause du signal RMN de l'acide gluconique. Cette meilleure précision s'explique très probablement par la méthode plus performante de traitement des données que permettait l'approche en continu. Rappelons de plus que si la précision de la mesure reste imparfaite à cause des problèmes de superposition de raies, la diffusion de l'acide gluconique suivait exactement la même tendance, avec des variations qui étaient même légèrement plus marquées (voir le *chapitre II* pour plus de détails sur ces points).

1.4. Evolution de la diffusion des PEGs au cours de la coagulation mixte

Les résultats de diffusion obtenus pour le PEG de 96750 g/mol au cours des coagulations acide et mixte sont illustrés en **Figure 6** en fonction du pH.

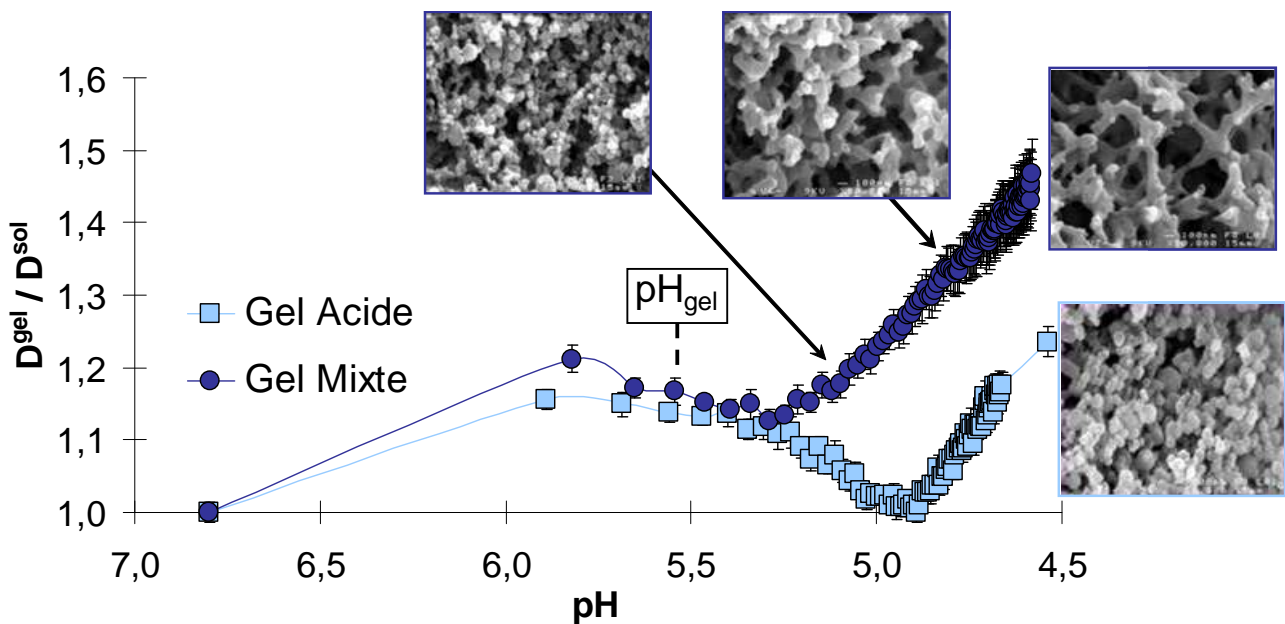


Figure 6 : Evolutions du coefficient de diffusion du PEG de 96750 g/mol et de la microstructure par MEB en fonction du pH au cours des coagulations acide et mixte.

Du pH initial à pH ~ 5,3, la diffusion du PEG est entièrement expliquée par l'acidification du milieu. La superposition des courbes « acide » et « mixte » permet d'ailleurs d'illustrer la bonne répétabilité de l'approche développée. Malgré l'action de la chymosine,

l'hydratation des particules en solution varie de façon identique à celle observée au cours d'une simple acidification. En revanche, peu après la gélification du système, c'est-à-dire après $\text{pH} \sim 5,3$, la diffusion de la sonde augmente régulièrement avec la porosité du gel comme le montre les images de MEB. En conséquence, cette seconde partie de la courbe s'explique par la contraction progressive du réseau, de façon cohérente avec l'interprétation proposée pour la coagulation présure.

Comme l'illustre la **Figure 7**, la diffusion du petit PEG est globalement identique à celle observée au cours de la coagulation acide. Les effets de la décroissance du pH sont donc supérieurs aux effets de contraction du réseau. Sachant que la structure interne des particules n'est que peu affectée par l'action enzymatique, mais qu'elle l'est grandement par l'acidification, ces résultats valident la prépondérance des effets de structure intra-agrégat sur la diffusion du PEG de 620 g/mol.

Remarquons aussi que l'évolution de l'angle de perte est cohérente avec les résultats de diffusion. Comme observé au cours de la coagulation présure, le début de la contraction du réseau est caractérisée par un maximum local de l'angle de perte peu après la fin de la transition sol-gel (**Figure 7**). De plus, un second maximum local de l'angle de perte, à $\text{pH} \sim 4,9$, coïncide avec l'augmentation de la diffusion du PEG de 620 g/mol. Notons qu'autour de ce pH, l'aspect du réseau change grandement (**Figure 6**) et que la rigidité des gels augmente subitement (*chapitre V*). Comme initialement révélé par la diffusion des PEGs durant la coagulation acide, l'ensemble de ces données confirme ainsi que les propriétés des systèmes étudiés changent fortement autour de $\text{pH} \sim 4,9$, c'est-à-dire lorsque le phosphate de calcium est totalement solubilisé.

L'ensemble de ces résultats confirme ainsi toutes les conclusions précédemment émises. La diffusion du PEG de grande taille est sensible au volume occupé par les particules puis par le réseau, tandis que celle PEG de 620 g/mol est principalement affectée par leur structure interne. Toutefois, ces résultats sont surtout remarquables car ils permettent de préciser certains mécanismes des processus de coagulation. En ce sens, les résultats obtenus pour le PEG de 96750 g/mol sont particulièrement riches d'enseignements.

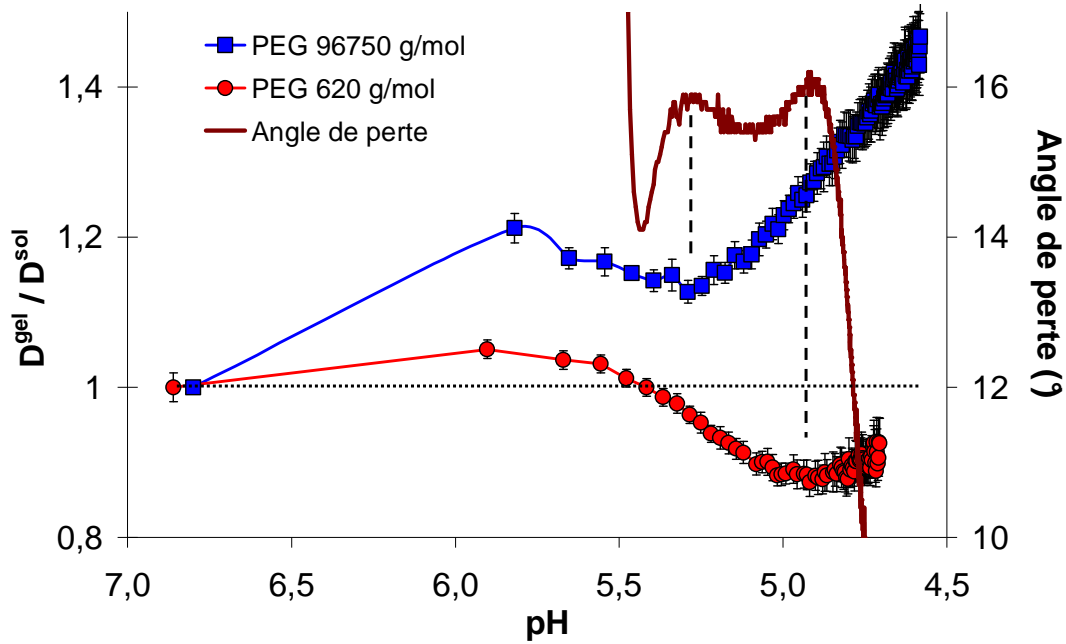


Figure 7 : Evolutions des coefficients de diffusion des PEGs 620 et 96750 g/mol et de l'angle de perte en fonction du pH au cours de la coagulation mixte.

Entre le pH initial et pH $\sim 5,9$, la diffusion de cette sonde est entièrement expliquée par la réduction de la taille des particules. Comme expliqué pour la coagulation acide, le mécanisme supposé est un « aplatissement » des caséines κ en surface des micelles. Cependant, l'action de la chymosine induit justement un relargage de la partie protubérante des caséines κ (le caséinomacropéptide ou CMP) dans la phase aqueuse. Or, les résultats obtenus lors de la coagulation présure ont démontré que ce phénomène n'a pas d'influence significative sur la diffusion du PEG de 96750 g/mol. En conséquence, si l'accroissement de la diffusion à pH $\sim 5,9$ était uniquement causé par « l'aplatissement » de ces protéines, alors le relargage du CMP au cours de la coagulation mixte aurait dû progressivement contrebalancer, au moins partiellement, cette augmentation (**Figure 6**). En effet, une partie importante du CMP avait été relarguée à pH $\sim 5,3$ puisque la gélification du système était complètement révolue (i.e. ~ 45 min après pH_{gel}). Nos données suggèrent donc que la réduction de la taille des particules en début d'acidification proviendrait plutôt d'une contraction globale de la micelle plutôt que du seul « aplatissement » des caséines κ .

Une autre conclusion intéressante provient des résultats obtenus pour ce même PEG (96750 g/mol) dans la seconde partie de la coagulation mixte. En effet, le coefficient de diffusion n'est apparemment plus influencé par l'acidification au-delà de pH $\sim 5,3$. Il s'en suit

que contrairement à l'évolution de la diffusion du PEG de 620 g/mol, de la rigidité, des paramètres rhéologiques et de l'aspect du réseau sur les images de MEB, l'augmentation de la porosité du gel mixte ne semble pas être influencée par la décroissance du pH (**Figure 7**, et pour plus de détails : *chapitre V*). Ce résultat est surprenant puisqu'il suggère qu'une fois le gel formé, l'accroissement de la porosité ne serait que peu dépendant de la modification des équilibres physico-chimiques, et de la réorganisation interne des particules qui s'opèrent durant l'acidification. En conséquence, ces résultats démontrent qu'une grande prudence est de rigueur lorsque l'on cherche à relier des données de porosité des gels avec des propriétés viscoélastiques, telles que la rigidité ou l'élasticité finale des produits.

Si d'autres expériences sont nécessaires pour valider ces conclusions, ces résultats démontrent le fort potentiel des mesures de diffusion pour apporter des informations sur les mécanismes de transformation des matrices laitières.

1.5. Conclusions

La mise en place d'une démarche de mesure en continu de la diffusion des PEGs au cours des processus de coagulation a permis :

- De proposer un modèle d'interprétation des mécanismes de diffusion en lien avec la structure des matrices caséiques. Ce sont des couples de taille du diffusant et d'échelle de structure qu'il faut considérer. Selon leur taille, les molécules peuvent diffuser plus ou moins facilement au travers des particules caséiques. Pour les molécules de grande taille, tel que le PEG de 96750 g/mol, la diffusion extra-micellaire est le mécanisme dominant. Par conséquent, la diffusion sera principalement affectée par l'hydratation de la phase caséique, c'est-à-dire par la taille des particules avant agrégation puis par la porosité du gel. A l'inverse, les molécules de petite taille, tel que le PEG de 620 g/mol, peuvent diffuser au travers des agrégats et du réseau caséique. Dans ce cas, la diffusion est fonction de la structure interne de la phase caséique. Ainsi, la diffusion des sondes est, selon leur taille, sensible à différentes échelles de structure. Enfin, l'amplitude des variations observées pour les diffusants de grande taille est plus importante car l'espace accessible à leur diffusion est, contrairement aux petites molécules, très affecté par les changements de structures à l'échelle qu'ils sondent (i.e. taille des particules, porosité du réseau).

- D'apporter des informations complémentaires aux mesures rhéologiques et aux images de MEB afin de mieux décrire l'évolution des matrices au cours de diverses transformations. Les images de MEB et la rhéologie ont servi de base pour expliquer les données de diffusion, et réciproquement, les suivis de la diffusion des sondes ont permis de caractériser certains phénomènes auxquels ces dernières méthodes n'étaient que peu ou pas sensibles. Alors que les images de MEB apportent des informations précieuses mais de façon discontinue, et que les techniques rhéologiques permettent de connaître l'évolution des propriétés macroscopiques des matrices, l'étude de la diffusion de sondes procure des informations en continu à des échelles microscopiques. Les méthodes couramment utilisées pour caractériser les particules colloïdales (les techniques de diffusion de la lumière, les mesures de viscosité...) ou les gels laitiers (perméamétrie, diverses techniques rhéologiques et de microscopie...) sont souvent invasives et/ou limitées à l'étude de systèmes soit liquides, soit gélifiés, et sont pour la plupart mal adaptées aux échantillons concentrés. L'approche développée dans ce projet semble donc prometteuse pour venir compléter le panel des techniques existantes, mais aussi, et peut être surtout, pour contribuer à combler le manque de techniques permettant de caractériser l'évolution structurale de matrices laitières concentrées.

- D'illustrer le potentiel des mesures de diffusion par RMN pour étudier des phénomènes cinétiquement lents. Les délais de mesure des coefficients de diffusion sont généralement trop longs pour étudier des systèmes hors équilibre. Toutefois, de nombreux processus sont, comme les coagulations laitières, des phénomènes relativement lents. Par exemple, les résultats de Baldursdottir *et al.*³⁰, présentés dans le paragraphe **3.2.1** du *chapitre I*, ont été obtenus avec des solutions d'alginate acidifiées par de la GDL : l'augmentation observée des coefficients de diffusion est-elle continue ? De même, il semble envisageable de caractériser la cinétique de formation des agrégats protéiques décrite par Laffite *et al.*⁵ (paragraphe **3.2.1** du *chapitre I*). Ainsi, de nombreux processus semblent pouvoir être suivis de façon continue par des mesures de diffusion. Rappelons également que plusieurs coefficients de diffusion peuvent souvent être déterminés lors d'une même expérience et que d'autres phénomènes peuvent influencer la diffusion des molécules, comme par exemple les phénomènes d'agrégation³¹. Il apparaît donc que l'étude de la diffusion de molécules au cours de divers procédés puisse devenir un réel outil pour caractériser une grande variété de changements structuraux.

Comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants, de nombreuses perspectives peuvent être proposées pour chacun de ces aspects.

2. Perspectives

2.1. Choix des sondes moléculaires

Nos travaux ont été conduits en étudiant deux PEGs ayant des tailles très différentes et montrant des effets contrastés. Aussi, la diffusion de molécules de taille intermédiaire ne serait-elle pas un moyen de mettre en évidence d'autres événements caractéristiques ? En étudiant la diffusion de telles sondes, pourrait-on mettre en évidence à la fois les changements de structure interne et de contraction/gonflement des agrégats caséiques ? Par exemple, au cours de la coagulation mixte (**Figure 7**), aurait-on pu distinguer un point singulier à pH ~ 5,3, qui marque le début de contraction du réseau, et celui à pH ~ 4,9, qui révèle semble-t-il la fin de la réorganisation interne des particules ? Une étude plus approfondie sur les facteurs influençant la diffusion de ces sondes ($10^3 < M_w < 10^5$) permettrait de répondre à ces questions. Notons que ces molécules présenteraient de plus l'avantage d'avoir des coefficients de diffusion distincts de celui de l'acide gluconique, ce qui permettrait de conserver une méthode de traitement des données simple et relativement précise.

La question se pose aussi de savoir si les PEGs sont les sondes les plus appropriées pour réaliser ce type d'étude. Comme présenté dans le paragraphe **3.1** du *chapitre I*, ces sondes possèdent de nombreux avantages. Cependant, il ressort de cette étude que leur emploi présente deux principaux inconvénients pour l'étude des matrices laitières. Premièrement, le signal des PEGs se superpose avec celui de l'acide gluconique (et du lactose), ce qui perturbe la détermination des coefficients de diffusion pour les sondes qui ont des masses moléculaires inférieures à environ 2000 g/mol. Deuxièmement, les PEGs sont des molécules flexibles et déformables. Cette propriété constitue un obstacle à l'élaboration d'un modèle mathématique qui permettrait de relier les données de diffusion à des données de structure. Aussi, l'emploi de nouvelles sondes, par exemple sphériques et non-déformables comme les dendrimères semblerait être une approche judicieuse.

2.2. Modélisation des données

L'un des principaux problèmes des études qui visent à étudier les modifications structurales en mesurant la diffusion de molécules-sonde provient du manque de modèles permettant d'analyser les données. Néanmoins, les expériences réalisées dans cette étude ont

permis d'identifier les principaux facteurs à prendre en compte pour expliquer l'impact de la structure des matrices caséiques sur la diffusion des PEGs.

Aussi, une voie prometteuse serait de construire un modèle permettant d'expliquer à la fois les effets de concentration, les effets de porosité des systèmes et les effets de taille des sondes. Le développement des outils de modélisation moléculaire devrait permettre à terme de décrire de tels phénomènes. De plus, plusieurs démarches ont été récemment entreprises en ce sens. Soulignons par exemple les travaux de Babu *et al.*³², qui ont montré en simulant des systèmes à bases de sphères (paragraphe 3.6 du *chapitre I*), que la diffusion d'espèces s'expliquerait principalement par la fraction volumique qui leur est accessible. Notons que l'utilisation de sondes non-déformables peut aussi être envisagée pour s'affranchir des problèmes de flexibilité des PEGs. Un modèle permettant de relier la diffusion de sondes à des paramètres de structure comme la porosité des gels ou la taille des particules permettrait en effet d'augmenter considérablement la valeur ajoutée de ce type d'expérience.

2.3. Peut-on caractériser d'autres types de changements structuraux ?

De nombreux travaux sont actuellement menés dans le but de développer des techniques permettant de suivre les évolutions des structures des matrices caséiques, notamment dans les systèmes concentrés. Les techniques microscopiques ont fait l'objet de développement à la fois pour accroître la sensibilité et la résolution des images et pour diminuer les artefacts induits par les protocoles de préparation des échantillons. Toutefois, l'utilisation de ces techniques d'une manière continue n'est pas encore d'actualité. D'autres méthodes ont été proposées telles que les mesures de turbidité²⁰, la diffusion multiple de la lumière²²⁻²⁴, des techniques à base d'ultrasons^{24,33}... Néanmoins, ces méthodes restent mal adaptées aux matrices concentrées. Dans ce contexte, la technique de PFG-RMN apparaît donc être une technique très prometteuse.

De nombreux phénomènes et procédés sont connus pour induire des modifications structurales dans les matrices laitières. Aussi, les paragraphes suivants visent à déterminer lesquels d'entre eux pourraient *à priori* être caractérisés par la méthode mise en place durant ces travaux.

2.3.1. Systèmes caséiques modèles

Il semble que l'étude de la diffusion de sondes puisse permettre d'étudier d'autres phénomènes qui sont connus pour affecter la microstructure des gels. Les plus évidents sont les effets des conditions de coagulation. En effet, les résultats que nous avons obtenus montrent que l'influence des paramètres tels que le pH à l'emprésurage, la concentration en enzyme, la température ou la cinétique d'acidification pourrait être caractérisée par des mesures de diffusion. Au-delà de ces paramètres, les effets d'autres procédés semblent aussi pouvoir être observés.

Par exemple, cette technique pourrait être appliquée à l'étude de la réticulation des protéines laitières par l'action enzymatique de la transglutaminase^{11,34-36}. La transglutaminase permet de modifier la structure interne des micelles de caséines en créant des réticulations intra-micellaires. Les particules résultantes présentent une stabilité colloïdale accrue et leurs propriétés à la coagulation présure et acide sont modifiées. Tout d'abord, des mesures de diffusion par RMN pourraient éventuellement permettre d'observer des variations des coefficients de diffusion au cours de l'action de la transglutaminase. Par la suite, les propriétés de gonflements/contraction des particules résultantes, ainsi que l'évolution structurale des gels fraîchement formés pourraient être caractérisées.

Si ces démarches peuvent être spécifiquement conduites dans des systèmes modèles composés de micelles de caséines, il est aussi envisageable d'explorer l'influence des autres constituants des produits laitiers sur les mécanismes de coagulation et sur les microstructures générées.

2.3.2. Produits plus complexes

Les autres constituants majoritaires du lait sont les protéines solubles (ou protéines sériques), la matière grasse et le lactose. Ces constituants ne sont pas tous stables vis-à-vis de certains traitements qui sont couramment utilisés. Au-delà des effets de composition, l'effet de ces procédés peut donc également affecter les mécanismes de coagulation et la microstructure finale des gels.

L'un des effets les plus étudiés est le traitement thermique des laits. En effet, celui-ci modifie les propriétés à la coagulation et la structure des matrices laitières (solutions et gels)

en dénaturant partiellement ou totalement les protéines sériques^{12,16,37-39}. La présence de protéines sériques dans la matrice ne devrait pas être un obstacle pour les mesures RMN. En effet, bien que plusieurs d'entre elles présentent un léger signal RMN autour de 3,6 ppm qui se superpose avec celui des PEGs, Colsenet *et al.*⁴ ont montré que la diffusion de PEGs de tailles variables pouvait être déterminée dans des solutions et gels de protéines sériques. Ces auteurs ont même étudié la diffusion de ces PEGs jusqu'à des concentrations d'environ 40 % en masse, sachant que la concentration de ces protéines dans le lait n'est que d'environ 0,5 % en masse.

Un second type de traitement également connu pour modifier la structure des gels est l'homogénéisation des matrices laitières. En effet, la matière grasse se présente sous forme de globules gras qui sont recouverts à l'état natif par une membrane biologique très peu réactive. A l'état natif, ils ne participent donc pas à l'établissement du réseau⁴⁰⁻⁴². Par contre, au cours de l'homogénéisation des laits, cette membrane s'abîme et des protéines viennent s'adsorber à la surface des globules gras. Si la concentration surfacique des protéines est suffisante, alors les gouttelettes lipidiques peuvent participer directement à la formation du réseau, ce qui modifie non seulement la microstructure des gels mais aussi les cinétiques des différentes coagulation⁴⁰⁻⁴².

Comme pour les protéines sériques, la présence des globules gras dans les matrices ne devrait pas être gênante pour mesurer la diffusion des PEGs. Ils sont constitués de triglycérides et possèdent donc des déplacements chimiques inférieurs à ceux du PEG. Ceci est illustré dans la **Figure 8** qui présente un spectre ¹H-RMN acquis à 500 MHz d'un lait homogénéisé⁴³. Les déplacements chimiques des protons de la matière grasse sont compris entre 0,5 et 2,3 ppm et autour de 5,2 ppm. Notons que les auteurs de cette étude ont également étudié un lait non homogénéisé bien qu'ils n'aient pas publié ce spectre. D'après eux, l'effet de l'homogénéisation se répercute sur le spectre par des signaux moins intenses et plus larges. Toutefois, il est fort probable que ceci n'affecte en rien la mesure de diffusion des PEGs compte-tenu des écarts de déplacement chimique. Il faut également ajouter que les globules gras ont nécessairement des temps de relaxation faibles. Les surfaces des raies devraient donc être atténuées dans les spectres de diffusion. De plus, en modulant la température, il est possible de minimiser le signal de ces lipides en induisant une cristallisation partielle de ceux-ci.

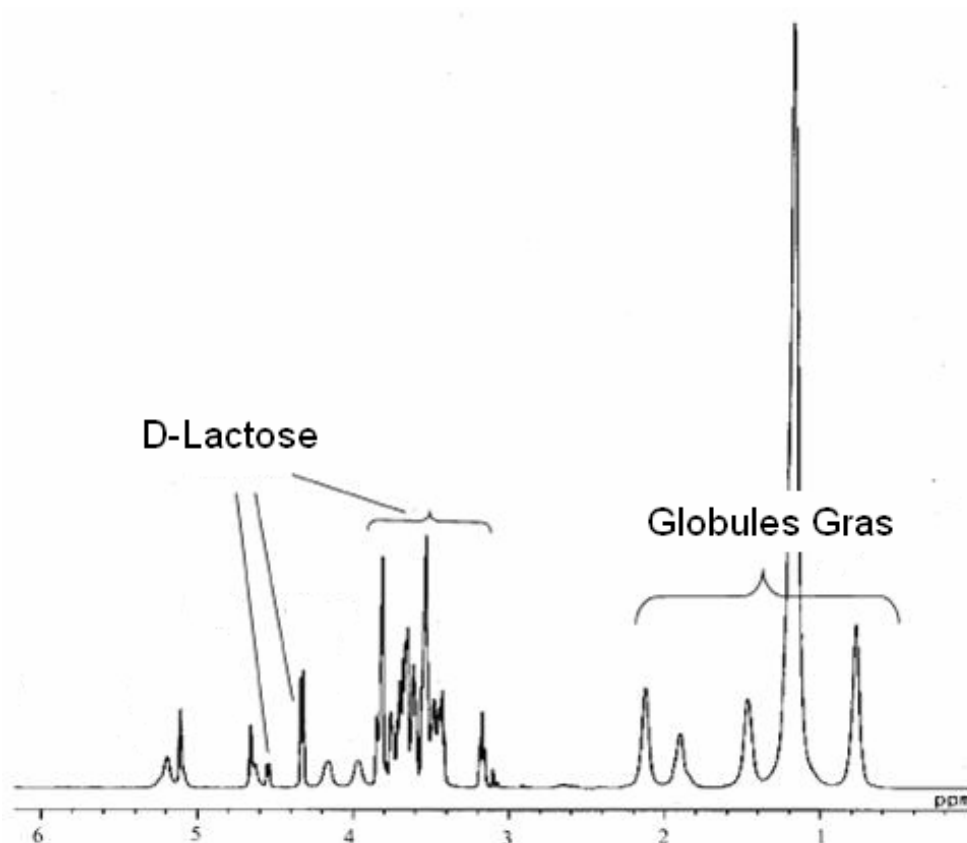


Figure 8 : Spectre ^1H -RMN d'un lait⁴³.

En revanche, le lactose présente de nombreux signaux autour du déplacement chimique des PEGs, à 3,6 ppm (**Figure 8**). Comme l'acide gluconique, le lactose (342 g/mol) devrait donc complexifier la détermination des coefficients de diffusion des petits PEGs. Par contre, sa contribution devrait être facilement déterminée dans les spectres de diffusion des PEGs de masse moléculaire importante. Le coefficient de diffusion des PEGs de grande taille, tel que celui de 96750 g/mol, resterait donc déterminable.

Par ailleurs, comme il l'a été évoqué dans les *chapitres II et V*, le coefficient de diffusion de l'acide gluconique (180 g/mol) présentait la même évolution que celui du PEG de 620 g/mol au cours des coagulations acide et mixte (**Figure 9**). Les évolutions de la diffusion du lactose seront donc *à priori* très similaires à celles observées pour le PEG de 620 g/mol. Le lactose pourrait donc être directement utilisé comme sonde moléculaire de petite taille.

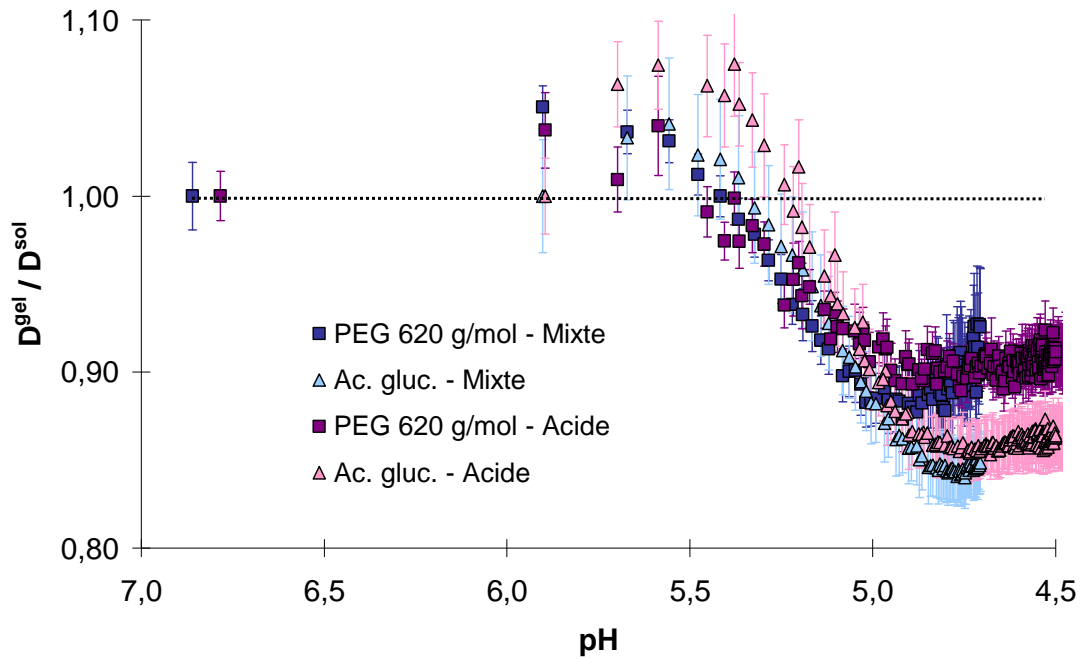


Figure 9 : Evolution des coefficients de diffusion de l'acide gluconique et du PEG de 620 g/mol au cours des coagulations acide et mixte.

Enfin, remarquons que l'emploi du lactose permettrait de réaliser l'acidification du milieu par des bactéries lactiques plutôt que de recourir à l'utilisation de la GDL. Compte-tenu des profils d'acidification qu'elles induisent, leur emploi présenterait l'avantage de permettre l'acquisition de plus de données de diffusion à des pH élevés (**Figure 10**).

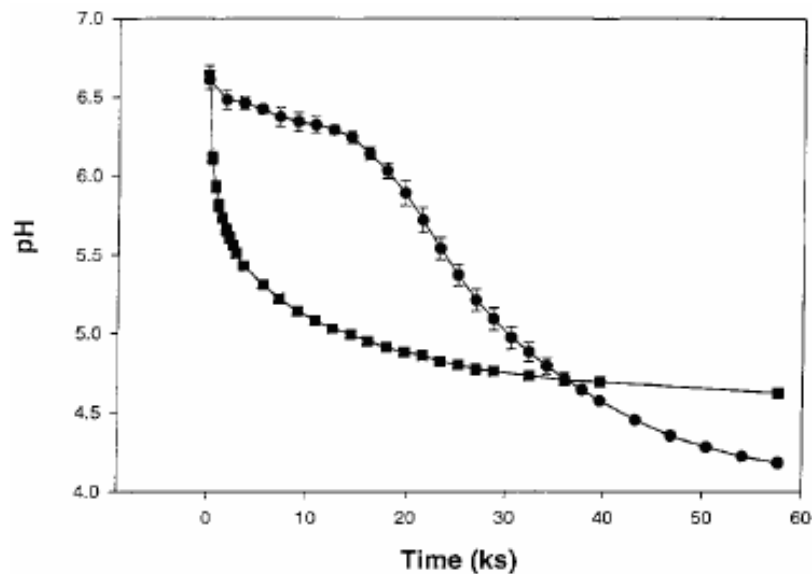


Figure 10 : Exemple de décroissances du pH à 30°C en fonction du temps et du procédé utilisé : acidification par la GDL (■) et par des bactéries lactiques (●) (Extrait de Lucey et al.⁴⁴)

Le suivi de la diffusion de molécules au cours de la coagulation de systèmes laitiers homogénéisés ou non, traités thermiquement ou non et induite par des bactéries lactiques pourrait donc être envisagé. Une étude préalable devrait néanmoins être réalisée pour savoir dans quelles mesures ces expériences seraient possibles et pour mieux appréhender les effets de composition sur la diffusion de molécules-sonde. Notons aussi que l'emploi de sondes ayant un autre déplacement chimique que celui des PEGs, par exemple autour de 2,6 ppm (**Figure 8**), pourrait être envisagé pour de telles études.

2.4. Existe-t-il d'autres informations dans les spectres de diffusion ?

Ce travail était basé sur la mesure du coefficient de diffusion de sondes moléculaires rajoutées au sein de la matrice. Toutefois, sur la base de cette étude, nous pouvons envisager d'autres développements, tel que l'étude de la diffusion des caséines, qui viendraient compléter les informations acquises. En effet, contrairement au lait entier, des signaux caractéristiques des caséines sont présents dans le spectre des suspensions (**Figure 11**).

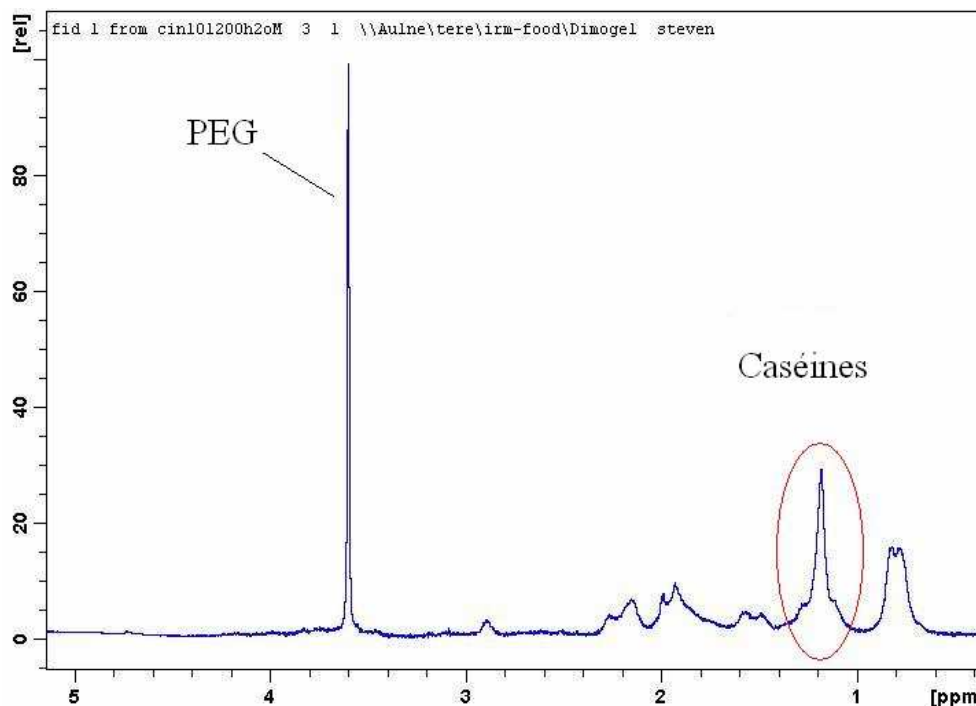


Figure 11 : Spectre de diffusion d'un PEG dans une suspension de micelle de caséines (~ 13 % en masse) à base d'H₂O.

Il convient de préciser que très peu d'études ont été réalisées sur le spectre ¹H-RMN des micelles de caséines compte-tenu de la difficulté d'analyse^{45,46}. Celles-ci ont néanmoins

montré que leur spectre est, *à priori*, constitué majoritairement par les signaux de segments de caséines κ et minoritairement par d'autres signaux qui proviendraient des régions aliphatiques des autres caséines⁴⁶. Néanmoins, nous avons essayé d'analyser le signal des caséines, à 1,2 ppm, qui était présent dans tous les spectres initialement acquis pour suivre la diffusion du PEG 96750 g/mol. Nous avons déterminé un coefficient de diffusion à partir d'une simple régression exponentielle sur les surfaces décroissantes de cette raie. Bien que les conditions d'acquisition ne fussent pas optimales, les résultats préliminaires laissent entrevoir des perspectives très intéressantes.

Les résultats obtenus au cours de la coagulation présure sont présentés en **Figure 12** avec l'évolution de l'angle de perte en fonction du temps après emprésurage.

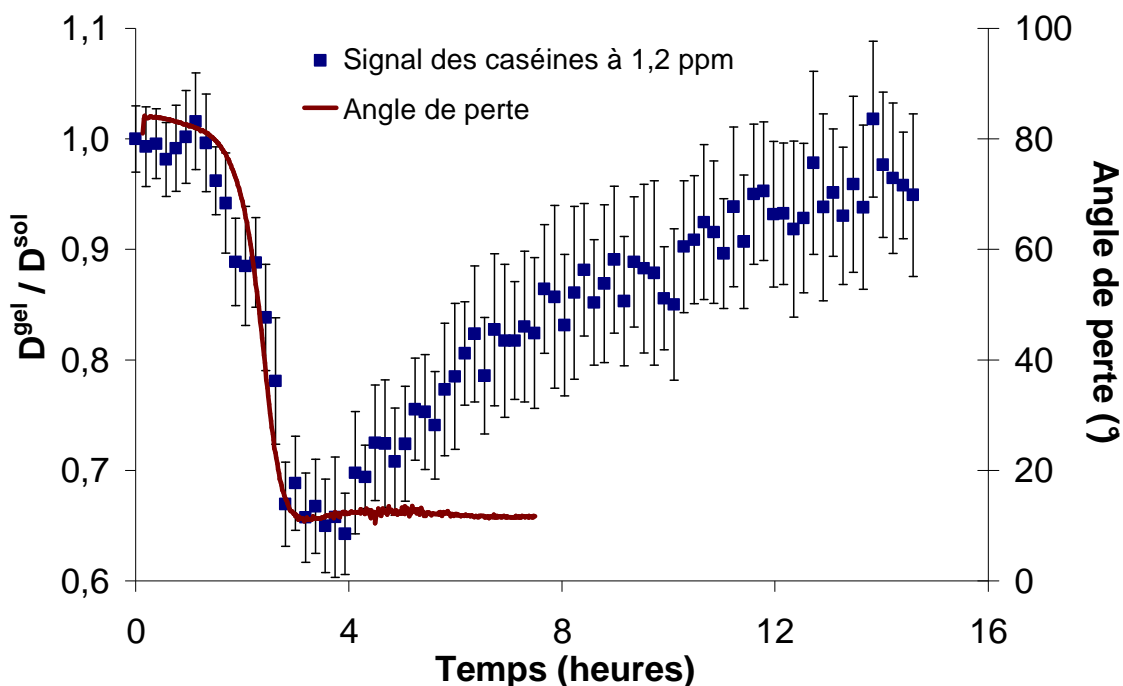


Figure 12 : Evolutions du « coefficient de diffusion des caséines » et de l'angle de perte au cours de la coagulation présure.

Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, le coefficient de diffusion n'est pas affecté par l'hydrolyse des caséines κ . La raie à 1,2 ppm ne semble pas donc refléter la partie C-terminale des caséines κ . Si tel avait été le cas, on aurait vraisemblablement dû constater une augmentation de la diffusion consécutive à la libération du caséinomacropéptide avant l'étape de gélification par la présure.

Ces données peuvent s'interpréter en supposant que le coefficient de diffusion mesuré reflète directement la mobilité des particules caséiques. Sachant que le coefficient de diffusion était d'environ $4 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ en solution, cette hypothèse paraît plausible. Pour comparaison, le PEG de 527000 g/mol, qui a un rayon hydrodynamique d'environ 37 nm, avait un coefficient de diffusion d'environ $1 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dans une solution similaire à base de D_2O . Aussi, dans la suite de la discussion nous partirons de l'hypothèse que le coefficient de diffusion mesuré reflète réellement celui des particules caséiques.

Contrairement à la diffusion du PEG, la variation du coefficient des caséines au cours de la coagulation présure est parfaitement corrélée avec la chute de l'angle de perte. Ces deux mesures sont donc sensibles au même phénomène : l'agrégation des particules caséiques. Celles-ci s'associent progressivement les unes aux autres et forment des agrégats de plus en plus volumineux. Ceux-ci diffusent donc de plus en plus lentement jusqu'à l'établissement d'un réseau macroscopique.

Une fois le réseau macroscopique complètement formé, le coefficient de diffusion devrait être nul. En effet, le réseau pouvant être considéré comme immobile, le signal RMN ne devrait plus s'atténuer. Toutefois, puisque le coefficient de diffusion mesuré n'est pas nul, il ne peut provenir que de particules et/ou agrégats caséiques libres de diffuser, c'est-à-dire non liés au réseau. Par conséquent, des diffusants d'une telle taille seraient d'une part fortement gênés par le réseau, c'est pourquoi ils diffuseraient plus lentement qu'en solution (**Figure 12**). D'autre part, ils seraient nécessairement très sensibles à l'accroissement de la porosité des gels qui s'opère dans le temps. C'est donc la contraction progressive du réseau qui expliquerait l'augmentation du coefficient de diffusion. L'étude de la diffusion des caséines permet donc non seulement de caractériser la transition sol-gel des gels présure mais aussi de suivre l'accroissement de la porosité qui s'opère place par la suite.

Comme illustré en **Figure 13**, les résultats obtenus au cours de la coagulation acide sont différents. A $\text{pH} \sim 5,9$, la diffusion des particules augmente puis diminue progressivement par la suite. Notons néanmoins qu'au-delà de $\text{pH} = 4,7$, c'est-à-dire au moment de la gélification, une chute plus importante de la diffusion semble s'initier bien que le manque de points ne permette pas de conclure.

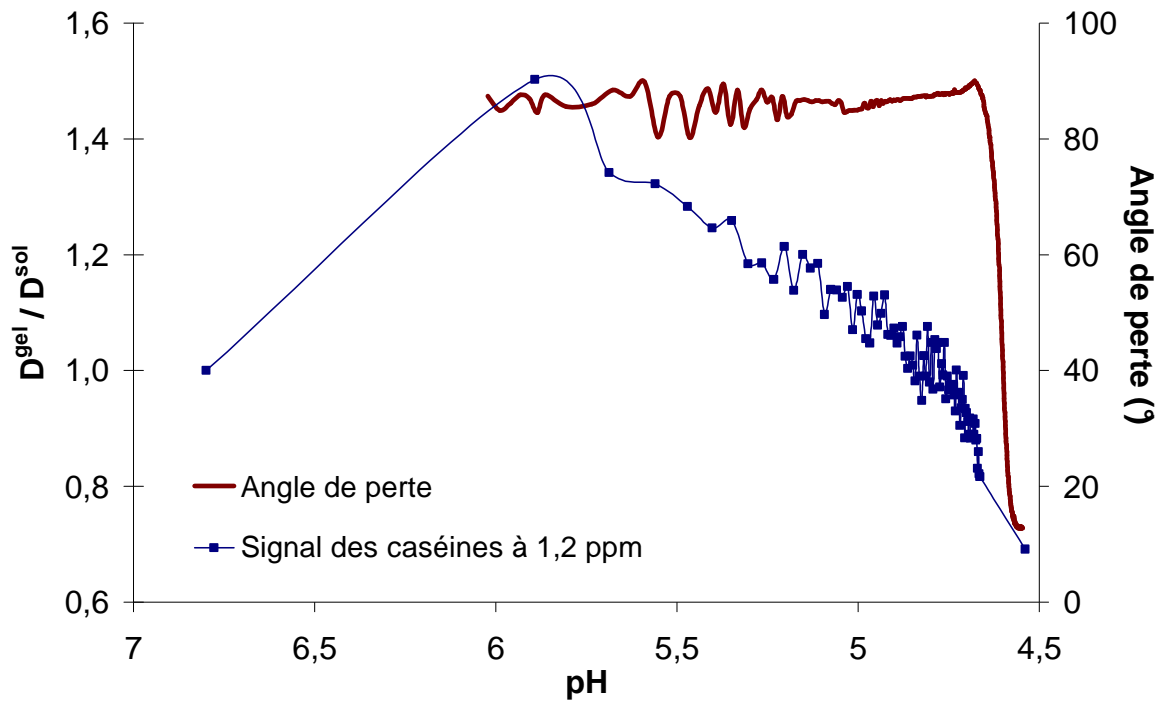


Figure 13 : Evolution de l'angle de perte et du coefficient de diffusion des particules caséiques au cours de la coagulation acide (les barres d'erreurs ont été ôtées pour plus de lisibilité).

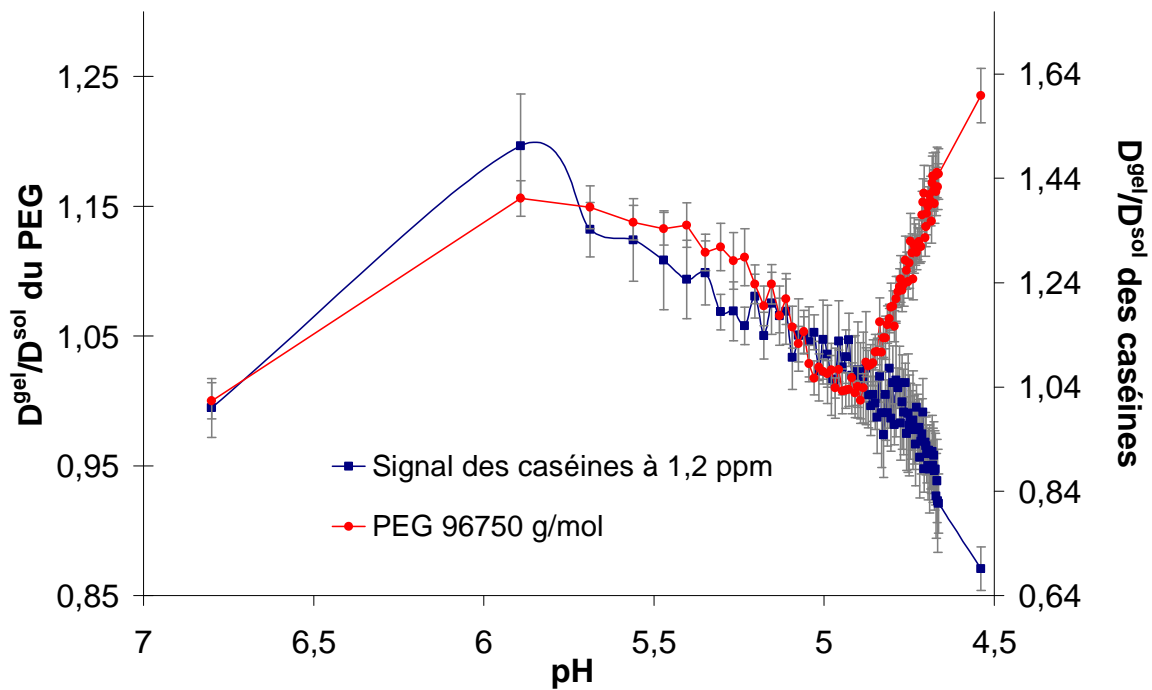


Figure 14 : Evolution des coefficients de diffusion des particules caséiques et du PEG de 96750 g/mol en fonction du pH au cours de la coagulation acide.

Ces résultats restent tout de même très intéressants puisqu'ils suggèrent que la diffusion des particules est également sensible à leurs variations de taille. La taille des particules diminuant autour de pH ~ 5,9, leur diffusion augmente. A l'inverse, lorsque la taille des particules augmente par la suite, leur diffusion diminue. En supposant que l'agrégation n'ait pas commencé, les particules caséiques recouvreraient donc leur taille initiale autour de pH ~ 4,9, c'est-à-dire lorsque $D^{\text{gel}}/D^{\text{sol}} = 1$. Une telle interprétation est en parfait accord avec l'analyse qui a été faite des résultats de la diffusion du PEG 96750 g/mol (**Figure 14**).

En revanche, au-delà de pH ~ 4,9, le coefficient de diffusion des particules diminue tandis que celui du PEG 96750 g/mol augmente. D'après notre analyse des phénomènes, cette évolution inverse implique que les particules commencent à s'agréger à partir de pH ~ 4,9. Cela sous-entend donc un mécanisme de coagulation impliquant une agrégation progressive (autour de pH ~ 4,9) suivie d'une agrégation plus franche (autour de pH ~ 4,6-4,7), ce qui serait en bon accord avec les résultats obtenus par diffusion multiple de la lumière sur des laits^{22,24}. L'ensemble des résultats suggèrent donc que l'agrégation des particules, la baisse d'hydratation de ces particules-agrégats et la fin de la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal sont trois phénomènes fortement liés.

Les résultats obtenus au cours de la coagulation mixte sont présentés en **Figure 15**. Dans un premier temps, à pH ~ 5,9, les particules diffusent plus rapidement suite à la réduction de leur taille, comme dans le cas de la coagulation acide. Dans un second temps, les particules s'agrégent suite à l'action de la présure. Ceci provoque une chute de la diffusion. Les particules et/ou agrégats non liés au réseau diffusent alors de plus en plus rapidement suite à l'accroissement de la porosité du gel. Toutefois, au-delà de pH ~ 4,9, le coefficient de diffusion est progressivement diminué, comme l'angle de perte. Cette réduction de la diffusion s'expliquerait donc par l'agrégation progressive des particules et/ou agrégats libres suite aux effets de l'acidification.

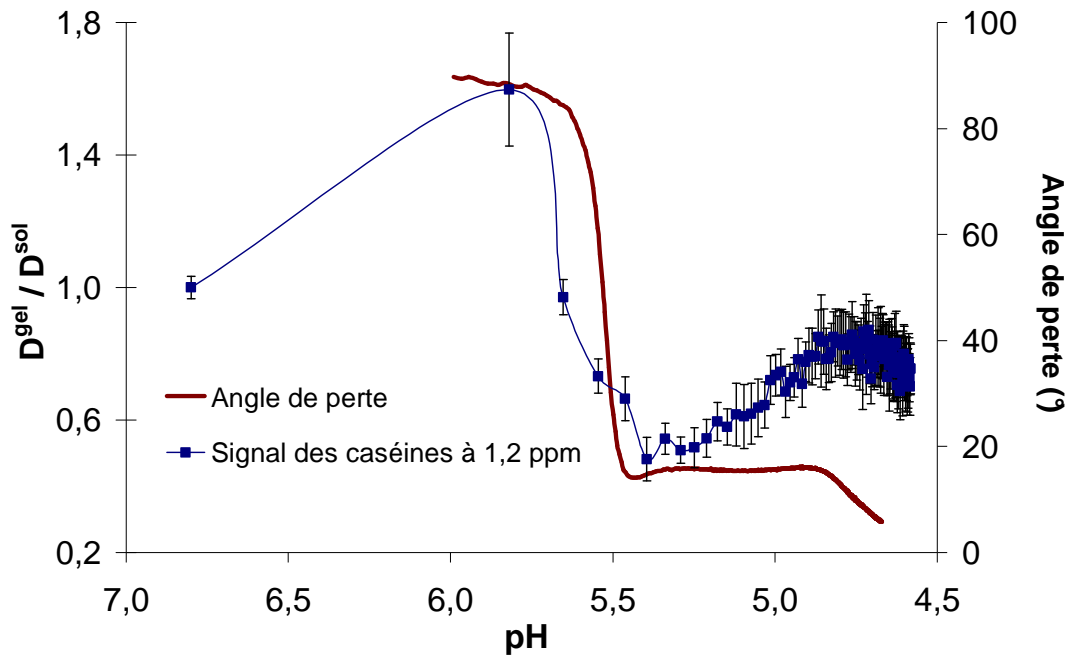


Figure 15 : Evolutions du coefficient de diffusion des particules caséiques et de l'angle de perte en fonction du pH au cours de la coagulation mixte.

Ainsi, ces résultats confirment ceux obtenus au cours de l'acidification et suggèrent que les particules et/ou agrégats qui n'étaient jusqu'ici pas associés au réseau le deviennent progressivement au-delà de $\text{pH} \sim 4,9$. Selon la quantité de particules restées libres après la transition sol-gel, on peut donc s'interroger sur l'impact de ce phénomène sur les propriétés macroscopiques du gel. Puisque tous les paramètres rhéologiques changeaient à ce pH, l'association des nouvelles particules au réseau contribue-t-elle à ces phénomènes ?

D'autres perspectives très intéressantes ressortent de l'ensemble de ces résultats. Celles-ci concernent notamment les amplitudes des variations observées. En effet, les augmentations de la diffusion sont identiques à $\text{pH} \sim 5,9$ dans les coagulations acide et mixte très certainement, car les changements de taille des particules sont les mêmes. Parallèlement, l'intensité de la contraction du réseau est liée aux amplitudes de variations des coefficients de diffusion. Aussi, pourquoi le coefficient de diffusion normalisé est d'environ 0,48 après la formation du gel mixte alors qu'il est de seulement 0,65 pour les gels acide et présure ? Ceci est-il répétable ? Ces variations sont-elles porteuses d'information ?

Ces résultats offrent également des perspectives dans la modélisation des données. Les particules de caséines peuvent en première considération être supposées sphériques, or les

méthodes actuelles permettent déjà de simuler la diffusion d'une sphère au milieu d'autres sphères. Les coefficients de diffusion mesurés pourraient donc être plus facilement reliés à la porosité des gels ou à la taille des particules.

Nous n'avons pas cherché à caractériser le relargage du caséinomacropéptide. Il est néanmoins possible qu'un tel phénomène puisse également être caractérisé. Si tel est le cas, l'acquisition régulière d'un simple spectre RMN, réalisée dans des conditions quantitatives, pourrait même suffire à caractériser le taux d'avancement de la réaction enzymatique.

Rappelons enfin que la diffusion est sensible à la dispersion en taille des espèces. Pourrait-on déterminer celle des particules caséiques ?

Ainsi, cette étude préliminaire a permis d'obtenir des résultats d'où ressortent des perspectives remarquables. La diffusion des caséines s'est révélée être sensible à la taille des particules, aux phénomènes d'agrégation et à l'accroissement de la porosité des gels durant leur vieillissement. De plus, toutes les variations de l'angle de perte étaient parfaitement corrélées avec celles du coefficient de diffusion. Ces données démontrent aussi que la diffusion de plusieurs espèces, procurant des informations différentes, peut être suivie au cours d'une même expérience et de façon totalement découplée. L'intérêt de la mesure de diffusion par RMN est donc de pouvoir caractériser des changements de structure des systèmes, sur un même échantillon, à la fois en termes de taille des particules et de porosité des gels mais aussi en termes de formation des agrégats. Tous ces résultats illustrent plus encore le fort potentiel de la technique de PFG-RMN pour caractériser les changements de structure des matrices caséiques concentrées.

Pour toutes ces raisons, une étude plus approfondie du spectre RMN des micelles de caséines et des phénomènes observés et observables semble très prometteuse.

3. Conclusion générale

Ce travail a permis de mieux appréhender les paramètres qui influencent la diffusion des PEGs dans les systèmes caséiques et en particulier l'effet qu'exerce la microstructure des échantillons. Sur la base des résultats obtenus, il a été possible de préciser les relations qui existent entre la taille des diffusants et les différentes échelles de structure des matrices caséiques. Les conclusions les plus intéressantes ont été tirées à partir des mesures de diffusion réalisées au cours des coagulations présure, acide et mixte. C'est effectivement par cette approche que la diffusion des PEGs a pu être reliée à la grande majorité des changements structuraux qui s'opèrent durant ces transformations.

Les variations de la diffusion d'un PEG de 620 g/mol étaient de faible amplitude. Elles ont cependant montré que l'évolution de la diffusion de cette sonde pouvait être reliée à des modifications de la structure interne des particules, ou du réseau caséique, suite à des modifications de leur compacité, ou suite au relargage du phosphate de calcium colloïdal. À l'inverse, la diffusion d'un PEG de 96750 g/mol était très sensible aux modifications structurales des matrices au cours des coagulations. Avant la transition sol-gel, l'évolution de la diffusion était révélatrice des changements de taille des particules caséiques. Après la transition sol-gel, celle-ci a permis de caractériser l'amplitude avec laquelle la porosité des gels augmente durant leur vieillissement. Tous ces résultats sont d'importance puisqu'il existe un réel manque de technique permettant de caractériser ces phénomènes de façon dynamique, notamment dans les matrices concentrées.

Ces résultats ont pu être expliqués en faisant l'hypothèse que les PEGs peuvent, jusqu'à une certaine taille, diffuser au travers des particules caséiques. Ceci permet d'expliquer pourquoi la diffusion du PEG de 620 g/mol est sensible à la structure interne des particules ou du réseau caséique, tandis que celle du PEG 96750 g/mol dépend de la taille des particules puis de la porosité des gels. Les différences d'amplitude des variations ont été expliquées par la relation entre l'échelle de structure et la taille diffusant. En effet, la diffusion du PEG de 96750 g/mol variait grandement car les changements de structure auxquels cette sonde était sensible induisaient des variations importantes du volume accessible à sa diffusion. Les faibles variations de la diffusion du PEG de 620 g/mol s'expliquent par le raisonnement inverse.

De part la complémentarité de la méthode employée avec les techniques de MEB et de rhéologie, ces travaux ont également permis de tirer quelques conclusions intéressantes sur certains mécanismes des coagulations.

Celles concernant la contraction des gels au cours de leur vieillissement sont sans doute parmi les plus intéressantes et les plus clairement établies. Les résultats obtenus suggèrent que l'initiation de ces processus peut se traduire par un maximum local de faible amplitude de l'angle de perte après la fin de la transition sol-gel. De plus, les résultats obtenus au cours de la coagulation mixte montrent que contrairement à la grande majorité des caractéristiques du gel, l'accroissement de sa porosité n'est apparemment pas ou peu affecté par les effets de l'acidification. Ces résultats suggèrent ainsi qu'une grande prudence doit être prise pour relier la porosité des gels à leurs propriétés macroscopiques.

Une autre conclusion concerne le mécanisme menant à la réduction de la taille des particules en début d'acidification. Si « l'aplatissement » des caséines κ en surface des micelles est le mécanisme généralement admis, il ne semble pas en mesure d'expliquer l'ensemble de nos données. Ces résultats préliminaires suggèrent effectivement qu'une contraction globale des particules en serait plutôt la cause. De plus, et en accord avec différentes études, nos résultats indiquent qu'au cours de l'acidification, la chute de l'hydratation des particules caséiques coïncide probablement avec la fin de la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal (PCC).

Enfin, une étude préliminaire d'un signal RMN des caséines a permis de montrer que d'autres informations pouvaient être retirées des spectres de diffusion. Celles-ci sont particulièrement intéressantes, notamment car elles permettent de caractériser les phénomènes d'agrégation, c'est-à-dire le principal phénomène qui ne pouvait pas être observé avec la diffusion des sondes. Ces résultats préliminaires suggèrent par exemple, en cohérence avec des études récentes, qu'au cours de l'acidification, l'agrégation des particules caséiques serait d'abord progressive puis s'accélérerait par la suite. De plus, l'agrégation semble s'initier au même moment que la chute d'hydratation, c'est-à-dire à la fin de la solubilisation du PCC. Rappelons également que le coefficient de diffusion mesuré s'est révélé être très sensible aux variations de taille des particules et à la porosité du réseau. Ces résultats obtenus à partir du signal des caséines sont donc très prometteurs.

Tous ces résultats illustrent ainsi le fort potentiel de ce type d'étude pour mieux comprendre et caractériser les phénomènes de coagulation des matrices laitières concentrées. En conséquence, de nombreuses perspectives ressortent de ce travail. Celles-ci concernent :

- L'étude des conditions de coagulation (température, concentration en enzyme...). L'approche développée semble permettre d'étudier de façon simple leur influence sur les différentes étapes des processus de coagulation, ou pour étudier la relation supposée entre la cinétique des coagulations et l'amplitude des réarrangements structuraux des gels.
- L'étude de matrices plus complexes. Les travaux réalisés au cours de cette étude ont montré que des matrices à base d'eau pouvaient être étudiées. Dans quelle mesure l'incorporation de globules gras, de protéines sériques et de lactose est-elle possible ? La présence de ces constituants permettrait d'étudier d'autres phénomènes connus pour modifier les propriétés des matrices à la coagulation (traitement thermique, homogénéisation...). De plus, l'incorporation de lactose permettrait d'employer des bactéries lactiques et donc d'acquérir plus de données de diffusion en début d'acidification, ou encore de caractériser les différences liées à ce type d'acidification avec celle induite par la GDL.
- Les sondes utilisées. Des PEGs de taille très différentes ont été choisis. Des PEGs de taille intermédiaire permettraient-ils de révéler à la fois les phénomènes mis en évidence par le PEG de grand poids moléculaire et par le PEG de petite taille ? L'emploi de molécules non déformable semble préférable pour l'élaboration d'un modèle mathématique. Quel type de sondes utiliser ? Des dendrimères ? Rappelons également que l'acide gluconique, et très probablement le lactose s'il est présent, peuvent directement être utilisé comme sondes de petites tailles. De la même façon, selon les informations recherchées, les caséines pourraient également faire office de sondes. Ainsi, l'incorporation de sondes externes dans la matrice ne serait pas toujours nécessaire.

- Le développement d’outil de modélisation ou de simulation. Est-il envisageable de remonter à des paramètres telle que la porosité des matrices ou la taille des particules à partir de coefficients de diffusion ? L’étude de la diffusion des caséines semble être adaptée pour valider une telle approche, qu’en est-il réellement ?
- Les expériences RMN. Les différents signaux des spectres de diffusion peuvent procurer des informations variées. Le paramétrage des expériences doit donc tenir compte des informations recherchées. Par exemple, si le suivi simultané de la diffusion d’une sonde de taille importante et des caséines est possible, rappelons que la proportion de GDL hydrolysée peut aussi être estimée. Pour améliorer la sensibilité de cette estimation, notons que l’acquisition régulière d’un spectre entre les mesures de diffusion est envisageable tout comme l’emploi d’une référence dans le spectre. L’acquisition régulière d’un spectre permettrait peut-être aussi de suivre l’hydrolyse de la caséine κ par la chymosine. Enfin, notons que le suivi du relargage du PCC entre deux mesures de diffusion semble également possible. Il a effectivement été montré que la relaxation de l’eau est sensible à ce phénomène⁴⁷. Des mesures de temps de relaxation alternée avec des mesures de diffusion peuvent donc être aussi envisagées.

Ainsi, ces travaux démontrent que la technique RMN, par l’intermédiaire des mesures de coefficients de diffusion, est particulièrement adaptée à l’étude des transformations des matrices caséiques.

4. Références

1. Colsenet, R., O. Soderman, and F. Mariette, *Effect of casein concentration in suspensions and gels on poly(ethylene glycol)s NMR self-diffusion measurements*. *Macromolecules*, **2005**. 38(22): p. 9171-9179.
2. Colsenet, R., M. Cambert, and F. Mariette, *NMR relaxation and water self-diffusion studies in whey protein solutions and gels*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**. 53: p. 6784-6790.
3. Colsenet, R., O. Soderman, and F. Mariette, *Effects of ionic strength and denaturation time on polyethyleneglycol self-diffusion in whey protein solutions and gels visualized by nuclear magnetic resonance*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(14): p. 5105-5112.
4. Colsenet, R., O. Soderman, and F.O. Mariette, *Pulsed field gradient NMR study of poly(ethylene glycol) diffusion in whey protein solutions and gels*. *Macromolecules*, **2006**. 39(3): p. 1053-1059.
5. Lafitte, G., O. Soderman, K. Thuresson, and J. Davies, *PFG-NMR diffusometry: A tool for investigating the structure and dynamics of noncommercial purified pig gastric mucin in a wide range of concentrations*. *Biopolymers*, **2007**. 86(2): p. 165-175.
6. Walther, B., N. Loren, M. Nyden, and A.M. Hermansson, *Influence of kappa-carrageenan gel structures on the diffusion of probe molecules determined by transmission electron microscopy and NMR diffusometry*. *Langmuir*, **2006**. 22(19): p. 8221-8228.
7. Mariette, F., D. Topgaard, B. Jönsson, and O. Söderman, *¹H NMR diffusometry study of water in casein dispersion and gels*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50(15): p. 4295-4302.
8. De Kruif, C.G., R. Tuinier, C. Holt, P.A. Timmins, and H.S. Rollema, *Physicochemical study of kappa- and beta-casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase*. *Langmuir*, **2002**. 18(12): p. 4885-4891.
9. O'Connell, J.E. and C.G. De Kruif, *Beta-casein micelles; cross-linking with transglutaminase*. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, **2003**. 216: p. 75-81.

10. Schorsch, C., H. Carrie, A.H. Clark, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 519-528.
11. Schorsch, C., H. Carrie, and I.T. Norton, *Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation*. International Dairy Journal, **2000**. 10(8): p. 529-539.
12. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid*. International Dairy Journal, **2001**. 11: p. 559-565.
13. Van Dijk, H.J.M. and P. Walstra, *Syneresis of curd. 2. One-dimensional syneresis of rennet curd in constant conditions*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1986**. 40: p. 3-30.
14. Mellema, M., J.W.M. Heesakkers, J.H.J. Van Opheusden, and T. Van Vliet, *Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry*. Langmuir, **2000**. 16(17): p. 6847-6854.
15. Mellema, M., P. Walstra, J.H.J. Van Opheusden, and T. Van Vliet, *Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels*. Advances in Colloid and Interface Science, **2002**. 98(1): p. 25-50.
16. Lucey, J.A., C.T. Teo, P.A. Munro, and H. Singh, *Microstructure, permeability and appearance of acid gels made from heated skim milk*. Food Hydrocolloids, **1998**. 12(2): p. 159-165.
17. Banon, S. and J. Hardy, *A colloidal approach of milk acidification by glucono-delta-lactone*. Journal of Dairy Science, **1992**. 75(4): p. 935-941.
18. Famelart, M.H., F. Lepesant, F. Gaucheron, Y. Legraet, and P. Schuck, *pH-induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: Influence of aqueous phase*. Lait, **1996**. 76(5): p. 445-460.
19. Vetier, N., S. Banon, J.P. Ramet, and J. Hardy, *Casein micelle solvation and fractal structure of milk aggregates and gels*. Lait, **2000**. 80(2): p. 237-246.
20. Gastaldi, E., A. Lagaude, S. Marchesseau, and B.T. De la Fuente, *Acid milk gel formation as affected by total solids content*. Journal of Food Science, **1997**. 62(4): p. 671-675.

21. Banon, S. and J. Hardy, *Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection*. Journal of Dairy Research, **1991**. 58: p. 75-84.
22. Alexander, M. and D.G. Dalgleish, *Application of transmission diffusing wave spectroscopy to the study of gelation of milk by acidification and rennet*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, **2004**. 38: p. 83-90.
23. Alexander, M., M. Corredig, and D.G. Dalgleish, *Diffusing wave spectroscopy of gelling food systems: The importance of the photon transport mean free path (l^*) parameter*. Food Hydrocolloids, **2006**. 20: p. 325-331.
24. Dalgleish, D., M. Alexander, and M. Corredig, *Studies of the acid gelation of milk using ultrasonic spectroscopy and diffusing wave spectroscopy*. Food Hydrocolloids, **2004**. 18(5): p. 747-755.
25. Gastaldi, E., A. Lagaude, and B.T. De la Fuente, *Micellar transition state in casein between pH 5.5 and 5.0*. Journal of Food Science, **1996**. 61(1): p. 59-65.
26. Dalgleish, D.G. and J.R. Law, *pH-induced dissociation of bovine casein micelles. 2. Mineral solubilization and its relation to casein release*. Journal of Dairy Research, **1989**. 56: p. 727-735.
27. Lee, W.J. and J.A. Lucey, *Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature*. Journal of Dairy Science, **2004**. 87(10): p. 3153-3164.
28. Van Hooydonk, A.C.M., H.G. Hagedoorn, and I.J. Boerrigter, *pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of acidification on physico-chemical properties*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1986**. 40: p. 281-296.
29. Roefs, S.P.F.M., P. Walstra, D.G. Dalgleish, and D.S. Horne, *Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1985**. 39: p. 119-122.
30. Baldursdottir, S.G., A.-L. Kjoniksen, and B. Nystrom, *The effect of riboflavin-photoinduced degradation of alginate matrices on the diffusion of poly(oxyethylene) probes in the polymer network*. European Polymer Journal, **2006**. 42(11): p. 3050-3058.

31. Abrahmsen-Alami, S. and P. Stilbs, *H-1-NMR self-diffusion and multifold H-2 spin relaxation study of model associative polymer and sodium dodecyl-sulfate aggregation in aqueous solution*. Journal of Physical Chemistry, **1994**. 98(25): p. 6359-6367.
32. Babu, S., J.-C. Gimel, and T. Nicolai, *Tracer diffusion in colloidal gels*. e-print cond-mat/0705.1266v1.
33. Kudryashov, E.D., N.T. Hunt, E.O. Arikainen, and V.A. Buckin, *Monitoring of acidified milk gel formation by ultrasonic shear wave measurements. High-frequency viscoelastic moduli of milk and acidified milk gel*. Journal of Dairy Science, **2001**. 84(2): p. 375-388.
34. O'Sullivan, M.M., A.L. Kelly, and P.F. Fox, *Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk*. Journal of Dairy Research, **2002**. 69(3): p. 433-442.
35. Mounsey, J.S., B.T. O'Kennedy, and P.M. Kelly, *Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar casein and products made therefrom*. Lait, **2005**. 85(4-5): p. 405-418.
36. Huppertz, T. and C.G. de Kruif, *Rennet-induced coagulation of enzymatically cross-linked casein micelles*. International Dairy Journal, **2007**. 17(5): p. 442-447.
37. Van Vliet, T., C.M.M. Lakemond, and R.W. Visschers, *Rheology and structure of milk protein gels*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2004**. 9(5): p. 298-304.
38. Schorsch, C., D.K. Wilkins, M.G. Jones, and I.T. Norton, *Gelation of casein-whey mixtures: effects of heating whey proteins alone or in the presence of casein micelles*. Journal of Dairy Research, **2001**. 68(3): p. 471-481.
39. Famelart, M.H., J. Tomazewski, M. Plot, and S. Pezennec, *Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein systems*. International Dairy Journal, **2004**. 14(4): p. 313-321.
40. Gavarić, D.J.C., M. ; Kalab, M., *Effects of protein concentration in ultrafiltration milk retentates and the type of protease used for coagulation on the microstructure of resulting gels*. Food Microstructure, **1989**. 8: p. 53-66.

41. Michalski, M.C., R. Cariou, F. Michel, and C. Garnier, *Native vs. damaged milk fat globules: Membrane properties affect the viscoelasticity of milk gels*. Journal of Dairy Science, **2002**. 85(10): p. 2451-2461.
42. Mistry, V.V. and D.L. Anderson, *Composition and microstructure of commercial full-fat and low-fat cheeses*. Food Structure, **1993**. 12(2): p. 259-266.
43. Hu, F.Y., K. Furihata, M. Ito-Ishida, S. Kaminogawa, and M. Tanokura, *Nondestructive observation of bovine milk by NMR spectroscopy: Analysis of existing states of compounds and detection of new compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**. 52(16): p. 4969-4974.
44. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro, *A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-delta-lactone*. Food Research International, **1998**. 31(2): p. 147-155.
45. Griffin, M.C. and G.C. Roberts, *A ¹H NMR study of casein micelles*. biochemistry Journal, **1985**. 228: p. 273-276.
46. Rollema, H.S., A. Brinkhuis, and H.J. Vreeman, *¹H-NMR studies of bovine κ -casein and casein micelles*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **1988**. 42: p. 233-248.
47. Mariette, F. and P. Marchal, *NMR relaxation studies of dairy processes*. Journal of Magnetic Resonance Analysis, **1996**. 2(4): p. 290-296.

Titre : Diffusion de sondes moléculaires mesurée par RMN à gradient de champ pulsé : Application à l'étude de l'évolution de la structure des systèmes caséiques au cours de la formation des gels

Résumé : L'objectif de ce travail était d'étudier l'influence qu'exerce la microstructure des matrices laitières sur la diffusion moléculaire.

Une première partie de ce travail a permis d'étudier la diffusion de sondes de taille variable, des polyéthylèneglycols (PEGs), dans des gels de caséines ayant différentes structures. Les variations des coefficients de diffusion ont été reliées à la porosité du réseau. Dans un second temps, ces résultats ont été complétés par la mesure en continu de la diffusion de sondes par RMN au cours de la formation des gels de caséines. Deux tailles de PEG ont été sélectionnées et leur diffusion a été mesurée au cours des procédés de coagulation présure, acide et mixte. L'évolution de la diffusion de la sonde de petite taille a été reliée aux modifications de structure et de porosité des agrégats micellaires, tandis que la diffusion du PEG de plus grande taille a été expliquée par la porosité du réseau. La confrontation de ces résultats avec des mesures rhéologiques et des images de microscopie électronique à balayage a permis de mettre en évidence les potentialités de la technique RMN à gradient de champ pulsé pour étudier les microstructures des matrices caséiques à différentes échelles.

Mots clés : RMN, diffusion, sonde, polyéthylèneglycol, micelle, caséine, lait, coagulation, gel, présure, chymosine, acide, mixte, MEB, rhéologie.

Title: Diffusion of molecular probes measured by pulsed field gradient NMR: Study of the evolution of the casein matrix structure throughout the formation of gels

Abstract: The aim of this study was to investigate the impact of the casein gel microstructure on molecular diffusion.

The first part of this work aimed at studying the diffusion of polyethyleneglycols (PEGs) of various sizes, used as molecular probes, in casein gels that had different microstructures. Variations in diffusion coefficient values were related to the network porosity. In the second part of this work, these results were supplemented by a continuous investigation of probe diffusion by NMR during the formation of casein gels. Two PEG sizes were selected and their diffusion coefficients were measured throughout the rennet, acid and combined coagulation processes. The evolution of the small probe diffusion was related to modifications in structure and porosity of casein aggregates, whereas the diffusion of the large probe was explained by network porosity. The comparison of these results with rheological measurements and scanning electron microscopy images revealed the potential of the pulsed field gradient NMR technique to study casein matrix microstructures at different length-scales.

Key-words: NMR, diffusion, probe, tracer, polyethyleneglycol, micelle, casein, milk, coagulation, dairy gel, rennet, chymosin, acid, SEM, rheology.