

Aptitude à la gélification thermique de la β -lactoglobuline : influence du pH, de l'environnement ionique et de la présence des autres protéines du lactosérum

P Gault, J Fauquant

INRA, laboratoire de recherches de technologie laitière,
65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes, France

(Reçu le 12 mars 1992; accepté le 12 juin 1992)

Résumé — La gélification thermique de la β -lactoglobuline (β -Lg) a été étudiée par des mesures rhéologiques en régime dynamique en fonction du pH (3,0 à 9,0–10,0), de la concentration en sels minéraux (NaCl, CaCl_2) et de la présence d' α -lactalbumine (α -La), de caséinomacropeptide (CMP) ou de sérum albumine bovine (SAB). La température (T_m) à partir de laquelle le module élastique (G') devient mesurable, diminue de 87,5 à 77,5 °C de pH 3,0 à 5,0; de pH 5,0 à 9,0, la T_m diminue de 77,5 à 60 °C dans le cas de la solution non électrodialysée, alors que la solution électrodialysée ne gélifie pas à pH 7,0 et 8,0. À même force ionique (μ), l'addition de CaCl_2 diminue la T_m de façon beaucoup plus efficace que la NaCl. La fermeté (G' à 95 °C) des gels de β -Lg présente une valeur maximale (G'_{\max}) de part et d'autre du pH isoélectrique de la β -Lg, et pour une μ optimale (100 mmol/l de NaCl ou 8,5 mmol/l de CaCl_2 à pH 7,0). À pH 7,0, le niveau de G'_{\max} et la μ correspondante sont 3–4 fois plus faibles dans le cas du CaCl_2 que dans celui du NaCl. Les gels de β -Lg présentent un aspect blanc et opaque dans une gamme de pH autour du pHi de la β -Lg d'autant plus large que la μ est élevée. En dehors de ces pH, le caractère translucide des gels s'accroît. Les autres protéines du lactosérum exercent une influence non négligeable sur la gélification de la β -Lg (pH 4,0 et 8,0). La T_m d'une solution de β -Lg diminue en présence d' α -La ou de SAB; cette dernière, de même que le CMP, améliore la fermeté des gels de β -Lg. Enfin, le CMP présente d'intéressantes propriétés gélifiantes individuelles (15%) à pH 4,0 et environ 20 °C.

β -lactoglobuline / α -lactalbumine / sérum albumine bovine / caséinomacropeptide /
gélification thermique / rhéologie dynamique

Summary — Heat-induced gelation of β -lactoglobulin. Influence of pH, ionic strength and presence of other whey proteins. Using dynamic rheological measurements, heat-induced gelation of β -lactoglobulin (β -Lg) was studied individually in different conditions (pH, mineral salts) and in mixture with α -lactalbumin (α -La), caseinomacropeptide (CMP) and bovine serum albumin (BSA). The temperature of the onset of gelation (T_m), defined as the temperature at which the elastic modulus (G') becomes measurable, decreased from 87.5 to 77.5 °C between pH 3.0 and 5.0; between pH 5.0 and 9.0, the T_m decreased continuously from 77.5 to 60 °C for the non-electrodialysed solution, whereas the electro-dialysed solution did not gel at pH 7.0 and 8.0. For the same ionic strength (μ), the addition of CaCl_2 decreased the T_m more efficiently than did the NaCl. A maximum of firmness (G'_{\max} at 95 °C) of 10% β -Lg gels was obtained on both sides of the isoelectrical pH (pHi) of β -Lg, and for an optimal μ (100 mmol/l of NaCl or 8.5 mmol/l of CaCl_2 at pH 7.0). At neutral pH, the level of G'_{\max} and the corresponding μ were 3–4-times lower for CaCl_2 than for NaCl. The gels of β -Lg were white and opaque in a pH range around the pHi of β -Lg; the higher the μ , the wider the pH range. Beyond this pH region, the gels became translucent. The heat-induced gelation of β -Lg was influenced by the other whey proteins (pH 4.0 and 8.0). Thus, the

T_m of a β -Lg solution decreased in the presence of α -La or BSA; the latter, and also the CMP, increased the firmness of β -Lg gels. Finally, the CMP (15%) was found to have interesting individual gelling properties at pH 4.0 and = 20 °C.

β -lactoglobulin / α -lactalbumin / bovine serum albumin / caseinomacropéptide / heat-induced gelation / dynamic rheology

INTRODUCTION

Dans la gamme des ingrédients protéiques utilisés dans l'industrie alimentaire, les concentrés de protéines de lactosérum (CPL) occupent une place de choix en raison de leurs très intéressantes propriétés nutritionnelles et fonctionnelles (Kinsella et Whitehead, 1989). Le développement des industries de la transformation du lactosérum repose actuellement sur l'amélioration des propriétés fonctionnelles, notamment thermo-gélifiantes, de ses constituants protéiques.

Les gels de protéines de lactosérum comme ceux des autres protéines globulaires sont définis comme un réseau tridimensionnel formé à partir d'une petite quantité de protéines emprisonnant beaucoup d'eau. La formation d'un gel de protéines résulte d'un équilibre critique entre les forces attractives intermoléculaires représentées par des liaisons covalentes, notamment des ponts disulfures, ou des liaisons non covalentes (de type Van der Waals, hydrophobe, ionique ou hydrogène), et les forces répulsives intermoléculaires (entre charges électriques de même signe) (Morr, 1979; Cheftel *et al*, 1985; Mulvihill et Kinsella, 1987). Cet équilibre dépend de la concentration en protéines, des caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, sels minéraux...) et de l'état des constituants présents, notamment protéiques. Selon la technologie de préparation du concentré de protéines de lactosérum, les gels obtenus présenteront alors des propriétés physiques va-

riables (Mc Donough *et al*, 1974; Dunkerley et Zadow, 1984; Kornhorst et Mangino, 1985; Kuhn et Foegeding, 1991). Deux principales catégories de gels ont été mises en évidence à partir des observations en microscopie électronique : les gels «particulaires» se caractérisant par un aspect opaque, une structure grossière hétérogène qui consiste en un réseau très ouvert d'agrégats de protéines, et les gels «moléculaires», souvent translucides, qui possèdent une structure fine et homogène (Stading et Hermansson, 1990).

En raison de la présence majoritaire de β -lactoglobuline (β -Lg) dans le CPL et de son aptitude individuelle à la thermo-gélification, cette protéine jouerait un rôle prépondérant dans le phénomène de thermo-gélification des CPL (Mulvihill et Kinsella, 1987; Kinsella et Whitehead, 1989). Comme pour les gels de CPL, les propriétés physiques des gels de β -Lg sont très dépendantes du pH et de l'environnement ionique de la solution. Ainsi, Stading et Hermansson (1990) ont observé une diminution du module élastique des gels de β -Lg de part et d'autre de pH 4,5–5,5. Matsu-domi *et al* (1991) ont mis en évidence une fermeté maximale des gels de β -Lg à pH 6,5. Ces auteurs ont également montré que des gels «particulaires» étaient obtenus dans une zone de pH (4,0–4,5 à 6,0–6,5) comprenant le pH isoélectrique (5,2) de la β -Lg. Le rôle de la composition minérale a également été démontré. À pH 8,0, Mulvihill et Kinsella (1988) et Mulvihill *et al* (1990) ont observé une fermeté maximale des gels de β -Lg pour une concentration en sels minéraux de 10 mmol/l de CaCl_2 ,

de 100 mmol/l de Na_2SO_4 , de 200 mmol/l de NaCl ou de 1 mol/l de NaSCN.

La participation des autres protéines du CPL au phénomène de gélfication a très peu été étudiée. Langley *et al* (1986) ont établi une corrélation positive entre la teneur en α -lactalbumine (α -La) et la fermeté des gels à pH 6,5, tandis que Kim *et al* (1987) n'observent aucune corrélation significative. Selon Paulsson *et al* (1986), l' α -La ne présenterait aucune aptitude à la thermo-gélfication en solution individuelle à pH 6,6; en outre, elle exercerait un effet dépresseur sur la gélfication de la β -Lg ou de la sérum albumine bovine.

Une meilleure compréhension du comportement gélfiant de la β -Lg peut permettre de mieux cerner le mécanisme de gélfication du CPL. À partir d'une méthode rhéologique en régime dynamique, nous nous sommes proposés de déterminer les caractéristiques rhéologiques de thermo-gélfication de la β -Lg en fonction du pH, de l'environnement ionique et de la présence ou non des autres protéines de lactosérum.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matières premières

Le lait écrémé pasteurisé et le lactosérum présure étaient fournis respectivement par la laiterie Bridel de l'Hermitage (France) et par la laiterie Prével de Montauban de Bretagne (France). Le sérum albumine bovine (SAB) provenait de chez Sigma Chemical Co (USA) (Référence A-7638).

Purification des protéines

La β -lactoglobuline

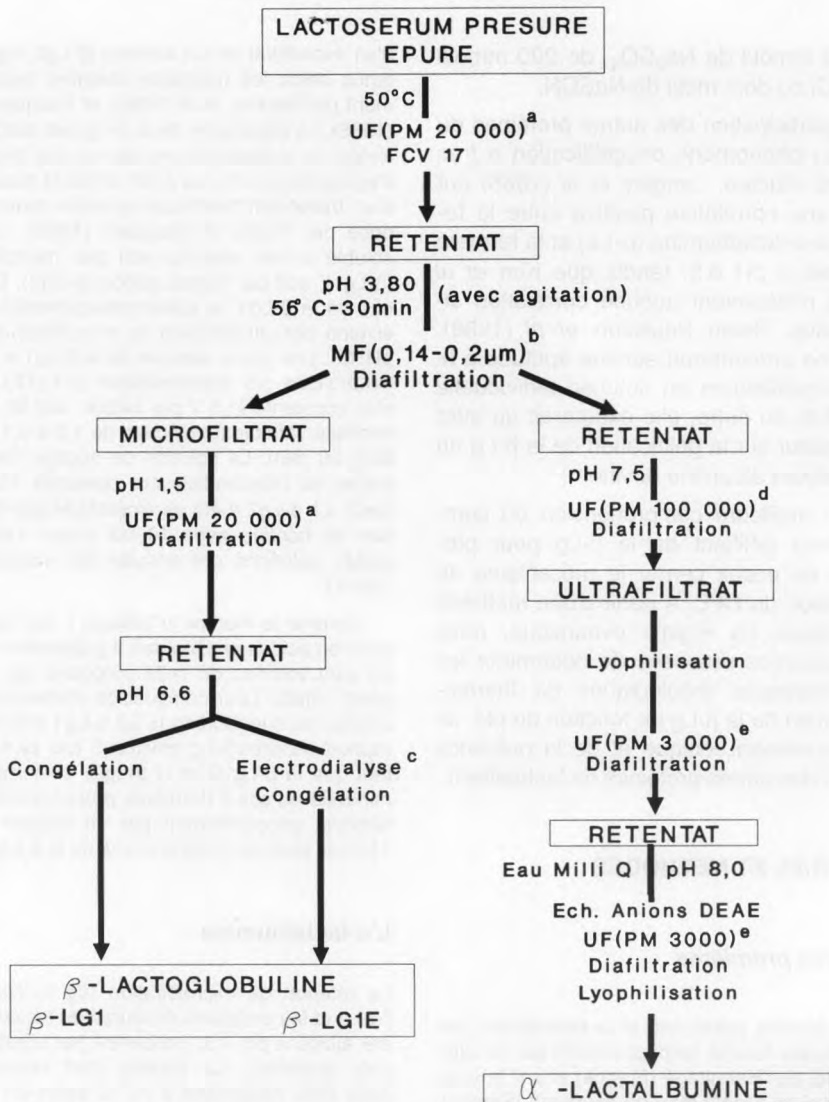
La β -lactoglobuline (β -Lg) a été préparée à partir d'un lactosérum présure épuré (β -Lg1, fig 1) ou

d'un microfiltrat de lait écrémé (β -Lg2, fig 2) obtenus selon les méthodes décrites respectivement par Baomy *et al* (1990) et Fauquant *et al* (1988). La séparation de la β -Lg des autres protéines du lactosérum repose sur les propriétés d'agrégation de l' α -La à pH acide et sous l'effet d'un traitement thermique modéré comme proposé par Pierre et Fauquant (1986). La β -Lg soluble a été séparée soit par microfiltration (β -Lg1), soit par centrifugation (β -Lg2). Dans le cas de la β -Lg1, le caséinomacropéptide a été éliminé par ultrafiltration du microfiltrat ajusté à pH 1,5. Une partie aliquote de la β -Lg1 a été déminéralisée par électrodialyse (β -Lg1E) à tension constante (1,5 V par cellule, soit 30 V) et à intensité variable (diminution de 1,3 à 0,1 A pendant 50 min). La solution de rinçage des électrodes de l'électrodialyseur contenait 10 g/l de NaCl. La β -Lg2 a été déminéralisée par diafiltration en continu avec 10 vol d'eau. Les différentes solutions ont ensuite été congelées à -20°C .

Comme le montre le tableau I, les compositions en acides aminés des 3 préparations de β -Lg sont voisines de celle proposée par Swaisgood (1982). Leur composition chimique est indiquée dans le tableau II. La β -Lg1 présente un rapport cendres/ β -Lg environ 5 fois plus important que la β -Lg1E et la β -Lg2. La composition minérale de ces 2 dernières préparations se différencie principalement par un rapport Ca/Na 150 fois plus élevé dans le cas de la β -Lg2.

L' α -lactalbumine

Le rétentat de microfiltration (fig 1) contenant l' α -La et les protéines mineures du lactosérum a été ajusté à pH 7,5, concentré par ultrafiltration puis lyophilisé. La poudre était resolubilisée dans l'eau désionisée à 30°C selon un rapport 1:20 et durant 2 h (agitation 500 tr/min). La fraction protéique non resolubilisée était éliminée par centrifugation (2 000 g, 10 min). La séparation de l' α -La des autres protéines a été effectuée à température ambiante sur un système Biopilot Pharmacia équipé d'une colonne «DEAE Sepharose Fast Flow» (diamètre 5 cm x hauteur 25,5 cm). L'élution des protéines a été réalisée par un gradient de force ionique de 0 à 0,5 mol/l de NaCl, et à un débit de 30 ml/min. Deux fractions d' α -La (F1 et F2), correspondant respectivement à l' α -La non glycosylée et glycosylée (Baomy et Fauquant, 1989), ont été



MF:microfiltration; UF:ultrafiltration; PM:poids moléculaire

a: module Rhône-Poulenc UFP10, membrane plane type IRIS 3038

c: électrodialyseur pilote P1 (Société CORNING ex.S.R.T.I.)

d: module Romicon, membrane à fibre creuse

e: module Filtron, membrane plane de type Omega Miniset

f: centrifugeuse Heraeus-Sepatech de type Cryofuge M7000

g: module Romicon, membrane spirale de type S10

Fig 1. Technologie de préparation de la β-lactoglobuline (β-Lg1 et β-Lg1E) et de l'α-lactalbumine à partir d'un lactosérum présure épuré (d'après Pierre et Fauquant, 1986; Baomy *et al*, 1990).

Diagram of processing of β-lactoglobulin (β-Lg1 and β-Lg1E) and α-lactalbumin from microfiltered rennet whey (adapted from Pierre and Fauquant, 1986; Baomy *et al*, 1990).

éluées respectivement à 0,17 et 0,22 mol/l de NaCl. À température ambiante, l' α -La collectée (F1 + F2) a ensuite été concentrée par ultrafiltration et diafiltrée en continu par 18 vol d'eau, puis lyophilisée. La composition en acides aminés de notre préparation d' α -La montre une grande similitude avec celle proposée par Swaisgood (1982) (tableau I). La composition chimique (tableau II) indique la présence de calcium selon un rapport calcium/MAT de 0,21% (p/p). Il s'agit probablement de calcium complexé à l' α -La, car selon Hiraoka *et al* (1980) et Kronmann *et al*

(1981), une mole de cette protéine peut fixer réversiblement 1 mole de calcium (soit 0,28%).

Le caséinomacropeptide

Le caséinomacropeptide (CMP) a été obtenu après addition de la présure (force 1/10 000) à une solution de caséinate de sodium. Ce dernier était préparé à partir de caséines de lait écrémé précipitées à la suite d'une double acidification à pH 4,6 (Brulé *et al*, 1980). Afin d'inhiber la présure résiduelle, le pH de la solution de CMP a été ajusté à 8,0. À température ambiante, le CMP a ensuite été concentré par ultrafiltration et diafiltré en continu avec 18 vol d'eau sur le module Filtron, puis lyophilisé. La composition en acides aminés du CMP préparé (tableau I) est globalement en accord avec celle établie par Alais (1984). La composition chimique de la poudre de CMP est indiquée dans le tableau II.

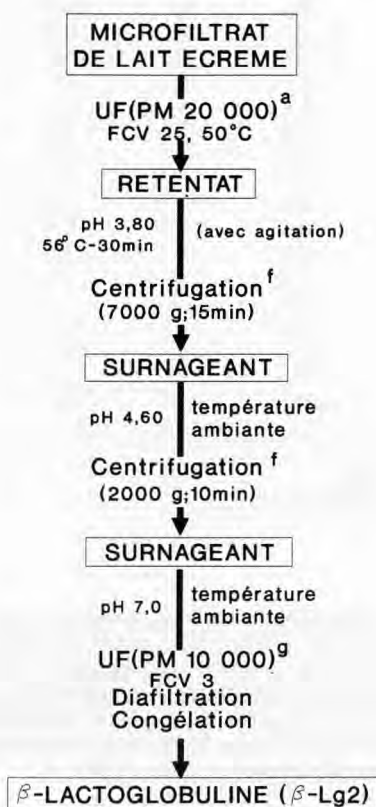


Fig 2. Technologie de préparation de la β -lactoglobuline (β -Lg2) à partir de lait écrémé microfiltré (d'après Pierre et Fauquant, 1986; Fauquant *et al*, 1988).

Diagram of processing of β -lactoglobulin (β -Lg2) from microfiltered skimmed milk (adapted from Pierre and Fauquant, 1986; Fauquant *et al*, 1988).

Analyses chimiques

La teneur en extrait sec (EST) a été déterminée par dessiccation à l'étuve à 102–105 °C pendant 5 h, selon la norme DSV donnée par Serres *et al* (1973). Le dosage des matières azotées totales (MAT) a été réalisé par la méthode macro-Kjeldahl à l'aide du système Tecator. La détermination des teneurs en azote non protéique (NPN) a été effectuée par dosage de l'azote total dans le surnageant après précipitation de la totalité des protéines en présence d'acide trichloroacétique à 12%, selon la méthode de Rowland (1938). Les teneurs en cendres ont été déterminées par incinération de la matière sèche dans un four à 530 °C, selon la norme DSV donnée par Serres *et al* (1973). La composition minérale a été réalisée par absorption atomique (Brulé *et al*, 1974). La β -Lg et l' α -La ont été dosées par chromatographie liquide haute performance (Pharmacia-LKB) sur une colonne Mono Q échangeuse d'anions HR 5/5 avec détection UV à 280 nm (Andrews *et al*, 1985); l'étalonnage a été réalisé à partir de β -Lg et d' α -La Sigma (référence respective L-0130 et L-6010). La composition en acides aminés a été déterminée à l'aide d'un analyseur Pharmacia-LKB (Alpha plus), selon la méthode de Spackman *et al* (1958). L'hydrolyse acide des échantillons a été effectuée sous vide par HCl 5,7 N à 110 °C durant 24 h. Enfin, les déterminations de pH ont

Tableau I. Composition en acides aminés des différentes protéines extraites à l'échelle pilote (nombre de résidus/mole).

Amino-acid composition for the different proteins manufactured at pilot scale (number of residues/mol).

Acides aminés	β -Lg			α -La		CMP	
	β -Lg*	β -Lg1 β -Lg1E	β -Lg2	α -La*	α -La	CMP**	CMP
Asx	16	17,3	16,4	21	21	5	4,8
Thr	8	9,1	8	7	8,2	12	10,6
Ser	7	7,5	7,2	7	8,7	6	5,2
Glx	25	29	28,9	13	16,7	10	11,2
Pro	8	11,9	10,9	2	5,1	8	7
Gly	3	3,6	3,2	6	6,7	1	1
Ala	15	13,5	15	3	3,9	5	4,9
Cys	5	3,4	2,9	8	5,3	—	0,2
Val	9	9	8,5	6	6,7	6	7
Met	4	3,3	3,4	1	0,3	1	0,6
Ile	10	8,5	8,2	8	6,5	6	5,7
Leu	22	22,7	23,7	13	13,6	1	1,3
Tyr	4	4	3,6	4	4,2	—	—
Phe	4	4,5	3,7	4	4,7	—	—
His	2	2	1,8	3	2,8	—	0,1
Lys	15	15	15	12	12	3	3
Arg	3	2,7	2,6	1	1,7	—	0,2
Trp	2	ND	ND	4	ND	—	ND

* Selon Swaisgood (1982); ** Selon Alais (1984); ND : non déterminée.

* According to Swaisgood (1982); according to Alais (1984); ND: not determined.

été réalisées avec un appareil type PHN-850 (Tacussel).

Préparation des solutions de protéines

La décongélation des solutions de β -Lg a été effectuée dans un bain d'eau porté à 30 °C. L'ajustement à la concentration en protéines souhaitée a été réalisé sur la base des protéines vraies (MAT-NPN) pour l'étude comparative des 3 préparations de β -Lg, et sur la base de la MAT pour l'étude de la gélification de la β -Lg en présence des autres protéines de lactosérum. La dilution de la solution de β -Lg a été effectuée à l'aide d'eau désionisée dans laquelle

était additionné un sel minéral (NaCl ou CaCl_2), ou bien une protéine (α -La, CMP ou SAB) à la concentration souhaitée. L'ajustement de pH était ensuite réalisé à l'aide de NaOH 5 N ou de HCl 5 N. La solution était agitée à faible vitesse (100 tr/min) pendant 90 min à température ambiante, puis désaérée durant 2 min.

Détermination de la force ionique

La force ionique (μ) de la solution de β -Lg a été calculée à partir des ions Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- apportés par la protéine ajoutée (α -La, CMP ou SAB) ou par les sels minéraux additionnés (NaCl ou CaCl_2).

Tableau II. Composition chimique des différents produits préparés à l'échelle pilote, en g/kg de solution (β -Lg) ou de poudre (α -La, CMP, SAB).*Chemical composition for the different products manufactured at pilot scale, in g/kg of solution (β -Lg) or powder (α -La, CMP, BSA).*

Composants	β -Lg1	β -Lg1E	β -Lg2	α -La	CMP	SAB
Extrait sec total (EST)	143,5	130	210,9	ND	ND	ND
Matière azotée totale (MAT)	132	126,6	206,8	942,7	839	987,4
Azote non protéique (NPN)	1,8	1,7	0,6	ND	ND	ND
β -lactoglobuline	120	112,6	> 200	ND	ND	ND
α -lactalbumine	3,5	3,3	< 5	ND	ND	ND
Cendres	12,1	2,9	4,92	ND	ND	ND
Ca	0,02	< 0,01	0,91	2	0,87	< 0,05
Mg	< 0,05	< 0,05	< 0,1	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Na	1,55	1	0,6	8,38	26,1	5,30
Cl	ND	ND	0,55	12,1	10	8,1
K	ND	< 0,01	0,37	< 0,1	< 0,1	< 0,1

ND : non déterminé.

ND: not determined.

Détermination des propriétés rhéologiques

La gélfication de la solution de protéines a été étudiée par une méthode rhéologique en régime dynamique utilisant le rhéomètre Carri-med à contrainte imposée, muni d'un système cône-plateau (diamètre 2 cm, angle 4°02'00") dont l'entrefer était ajusté à 25 °C. Une couche d'huile de vaseline recouvrait l'extérieur de l'échantillon en contact avec l'air de façon à limiter la concentration par évaporation de la solution étudiée. Les modules élastique (G') et visqueux (G'') ont été déterminés à une fréquence de 1 Hz et une déformation de 2,8 ou 5,7%.

Après une stabilisation thermique de 15 min à 55 °C puis de 5 min à 60 °C, les mesures étaient effectuées tous les 2,5 °C jusqu'à 95 °C,

à raison d'une augmentation de 0,7 °C/min. La température à partir de laquelle le module élastique devient mesurable correspond à un seuil de détection du phénomène de gélfication, étroitement dépendant de la sensibilité de l'appareil mis en œuvre; cette température a été dénommée au cours de cette étude «température minimale de gélfication (T_m)». La fermeté des gels a été estimée à partir de la valeur du module élastique (G') à 95 °C. Les coefficients de variation du G' à 95 °C et de la T_m étaient d'environ 10%.

Pour l'étude portant sur l'influence des autres protéines du lactosérum sur la thermo-gélfication de la β -Lg, la fermeté des gels a été estimée à partir du module élastique déterminé après un chauffage de 90 °C–30 min à la suite d'une montée en température de 25 à 90 °C à raison de 15 °C/min.

RÉSULTATS

Gélfication des solutions de β -lactoglobuline : influence du pH et de l'environnement ionique

En raison d'un coefficient de variation du module visqueux (G'') supérieur à 100% à la température minimale de gélfication, et de 20–30% à 95 °C, seules les valeurs du module élastique (G') ont été exploitées. Cette variabilité du G'' est probablement la conséquence d'une part de la faible déformation (2,8%) appliquée au gel, déformation proche de la limite inférieure de sensibilité du Carrimed (2%), et d'autre part du caractère essentiellement élastique des gels de β -Lg. La $\tan \delta$ ($= G''/G'$) à 95 °C a en effet été estimée à une valeur $< 0,20$ quels que

soient le pH et la force ionique de la solution, confirmant ainsi les travaux de Stading et Hermansson (1990) et Paulsson *et al* (1990).

Influence du pH

La figure 3 montre l'évolution de la température minimale de gélfication de pH 3,0 à 9,0–10,0 de la solution de β -Lg1 déminéralisée par électrodialyse (β -Lg1E) ou non (β -Lg1) et de la β -Lg2 à 10% de protéines. À pH 3,0, la T_m est voisine pour les 3 solutions, et diminue de 87,5 à 77,5 °C entre pH 3,0 et 6,0.

La β -Lg1E et la β -Lg2 ne présentent pas de propriétés gélfiantes respectivement à pH 7,0 et 8,0, et 8,0 et 9,0. Ces 2 solutions gélfient respectivement à partir de pH 9,0 (67,5 °C) ou 10,0 (77,5 °C). Dans le cas de la solution de β -Lg1 non

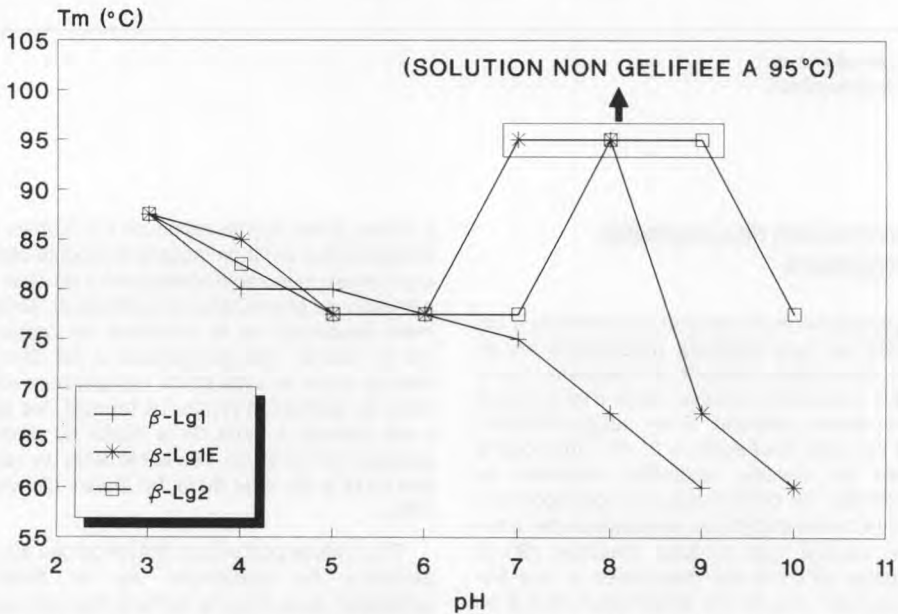


Fig 3. Influence du pH sur la température minimale de gélfication (T_m) des 3 préparations de β -Lg à 10% de protéines – montée en température de 60 à 95 °C à raison de 0,7 °C/min.

Effect of pH on the temperature of the onset of gelation (T_m) for the 3 preparations of β -Lg at 10% protein; heating rate 0.7 °C/min from 60 to 95 °C.

électrodialysée, une diminution de la T_m de 77,5 °C à 60 °C a été observée entre pH 6,0 et 9,0.

À pH 5,0 (fig 4), les gels présentent une valeur du G' très faible (< 0,6 kPa) pour les 3 solutions étudiées. En deçà et au-delà de cette valeur de pH, le G' augmente. À pH < 5,0, il s'accroît jusqu'à pH 4,0 pour la β -Lg1E, et jusqu'à pH 3,0, pour la β -Lg1 et la β -Lg2; à pH > 5,0, les valeurs du G' sont plus élevées à pH 6,0 pour les gels de β -Lg1E et de β -Lg2, et à pH 7,0 pour les gels de β -Lg1. Les gels de β -Lg1 présentent un aspect blanc et opaque de pH 3,0 à 9,0. Ceux obtenus à

partir de la β -Lg1E et de la β -Lg2 sont également blancs et opaques mais dans une zone de pH plus restreinte (respectivement 4,0 à 6,0 et 4,0 à 7,0); en dehors de ces pH, le caractère translucide des gels est marqué.

Influence du NaCl et du CaCl_2

À pH 7,0 et à 10% de protéines, l'élévation de la force ionique (μ) entraîne une diminution de la T_m (fig 5). De plus, l'effet de la force ionique est très dépendant de la nature des sels minéraux mis en œuvre : pour atteindre une T_m de

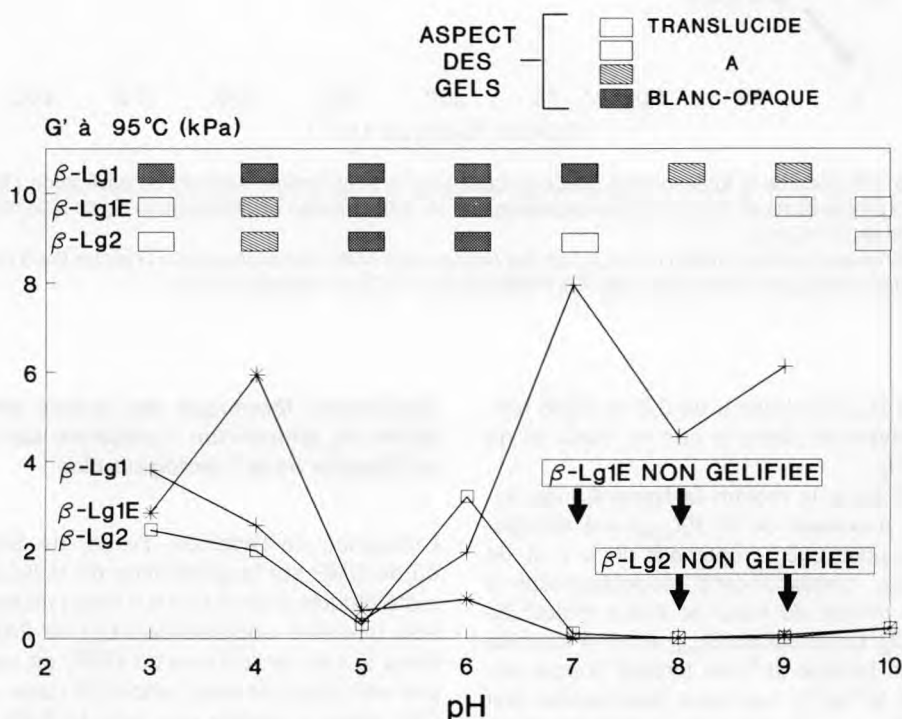


Fig 4. Influence du pH sur le module élastique (G') et sur l'aspect de gels obtenus à partir des 3 préparations de β -Lg à 10% de protéines, à la suite d'une montée en température de 60 à 95 °C à raison de 0,7 °C/min.

Effect of pH on the elastic modulus (G') and the aspect of gels at 10% protein for the 3 preparations of β -Lg; heating rate 0.7 °C/min from 60 to 95 °C.

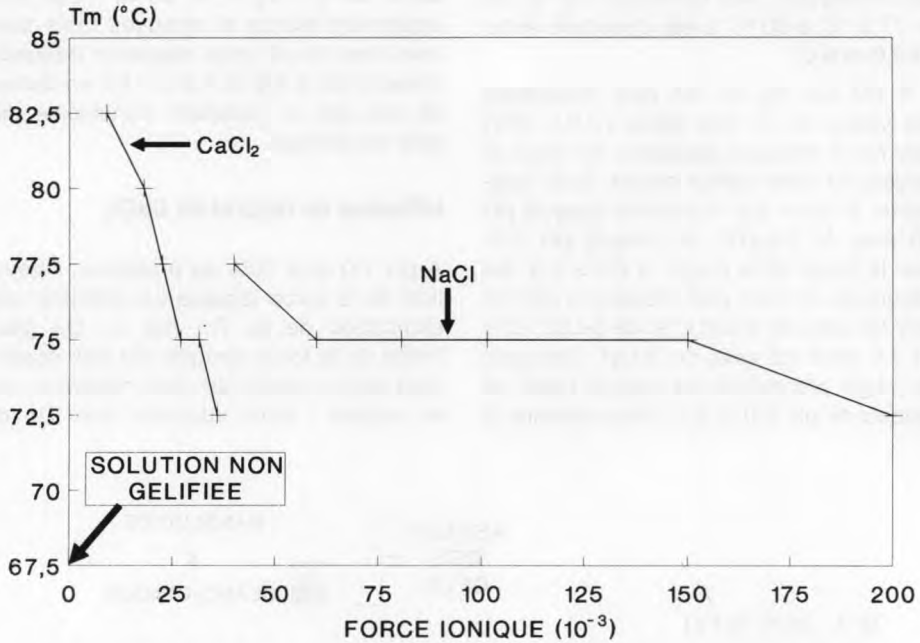


Fig 5. Influence de la force ionique (NaCl ou CaCl₂) sur la température minimale de gélification (T_m) des 3 préparations de β -Lg à 10% de protéines et à pH 7,0 – montée en température de 60 à 95 °C à raison de 0,7 °C/min.

Effect of ionic strength (NaCl or CaCl₂) on the temperature of the onset of gelation (T_m) for the 3 preparations of β -Lg at 10% protein; pH 7.0, heating rate 0.7 °C/min from 60 to 95 °C.

72,5 °C, il faut une μ de 0,2 et 0,036 respectivement dans le cas du NaCl et du CaCl₂.

Comme le montre la figure 6, une valeur maximale du G' (G'_{max}) est enregistrée pour une μ optimale de 0,1 et de 0,025, correspondant respectivement à 100 mmol/l de NaCl et à 8,5 mmol/l de CaCl₂. La valeur du G'_{max} est 3–4 fois plus faible lorsque la force ionique a pour origine le CaCl₂. Les gels, translucides aux faibles μ , deviennent progressivement blancs-opaques et présentent une synérèse (observations visuelles) accrue à partir de forces ioniques voisines de celle permettant d'obtenir le G'_{max} .

Gélification thermique des autres protéines du lactosérum - Influence sur la gélification de la β -lactoglobuline

L'influence de l'addition d' α -La, de SAB ou de CMP sur la gélification de la β -Lg2 a été étudiée à pH 4,0 et 8,0 selon un rapport (protéine additionnée/ β -Lg) de 23%. Dans le cas de l' α -La et du CMP, ce rapport est voisin de celui rencontré dans un CPL présure, tandis que pour la SAB, il est environ 4 fois supérieur. Le niveau de concentration en protéines a été choisi par rapport au domaine de sensibilité du Carrimed.

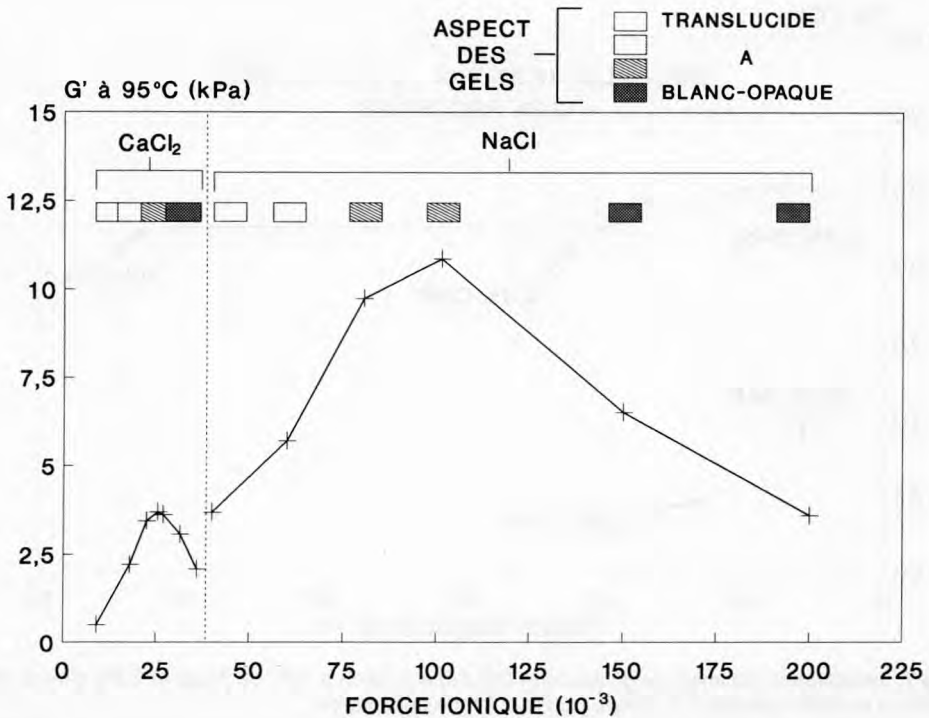


Fig 6. Influence de la force ionique (NaCl ou CaCl₂) sur le module élastique (G') et l'aspect de gels obtenus à partir des 3 préparations de β -Lg à 10% de protéines et à pH 7,0, suite à une montée en température de 60 à 95 °C à raison de 0,7 °C/min.

Effect of ionic strength (NaCl or CaCl₂) on the elastic modulus (G') and the aspect of gels at 10% protein for the 3 preparations of β -Lg; pH 7.0, heating rate 0.7 °C/min from 60 to 95 °C.

Les 3 protéines étudiées ne sont pas pures à 100% mais associées à une charge minérale caractéristique de chacune d'entre elles (tableau II). De façon à déterminer l'effet propre de l' α -La, du CMP ou de la SAB sur la gélification de la β -Lg, nous nous sommes alors affranchis de l'effet «force ionique» via l'étude de la β -Lg à différentes teneurs en NaCl. Cette démarche ne tient néanmoins pas compte de l'effet spécifique du calcium présent en quantité non négligeable dans la poudre d' α -La et de CMP.

Température minimale de gélification des gels de β -Lg en présence ou non d' α -La, de CMP ou de SAB

À pH 4,0 (fig 7), l'augmentation de la concentration en β -Lg de 10% à 12,3% n'entraîne aucun changement de la T_m (85 °C). L'addition de 2,3% d' α -La ou de SAB diminue de façon très significative la T_m des solutions mixtes, respectivement de 20 et 17,5 °C. En revanche, la présence de CMP n'affecte pas la T_m de la solution de β -Lg.

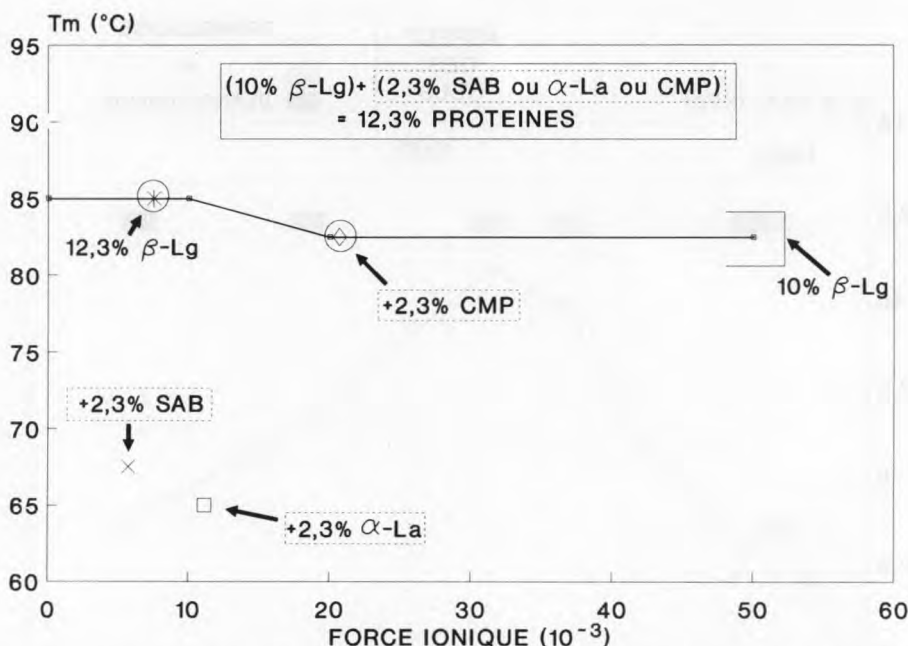


Fig 7. Température minimale de gélification (T_m) d'une solution à 10% de β -Lg2 et 2,3% d' α -La, de CMP ou de SAB – pH 4,0, 0,7 °C/min, 0,5 Hz, 2,8% de déformation.

Temperature of the onset of gelation (T_m) for a solution at 10% of β -Lg2 and 2.3% of α -La, CMP or BSA at pH 4.0; heating rate 0.7 °C/min from 60 to 95 °C, 0.5 Hz, strain 2.8%.

À pH 8,0 (fig 8), une diminution de la T_m d'environ 5 °C a été observée avec l'élévation de la concentration en β -Lg de 13 à 16%. L'addition de 3% d' α -La, de CMP ou de SAB dans la solution à 13% de β -Lg diminue également la T_m de 5 °C.

Module élastique à 90 °C–30 min des gels de β -Lg en présence ou non d' α -La, de CMP ou de SAB

À pH 4,0 (fig 9), une différence non significative a été observée entre le G' à 90 °C–30 min des gels obtenus à 10% et 12,3% de β -Lg. De même, l'addition de 2,3% d' α -

La à la solution à 10% de β -Lg n'a pas d'effet significatif sur la valeur du G' . En revanche, la présence de 2,3% de SAB ou de CMP dans la solution de β -Lg augmente respectivement de près de 50 et 180% la valeur du G' des gels.

À pH 8,0 (fig 10), l'augmentation de 13 à 16% de β -Lg entraîne une élévation d'environ 100% de la valeur du G' . La présence de 3% d' α -La dans la solution à 13% de β -Lg n'a pas d'effet significatif sur la fermeté des gels, tandis que la SAB et le CMP se révèlent être très favorable à l'obtention de gels de β -Lg plus fermes : la valeur du G' augmente respectivement d'environ 100 et 80%.

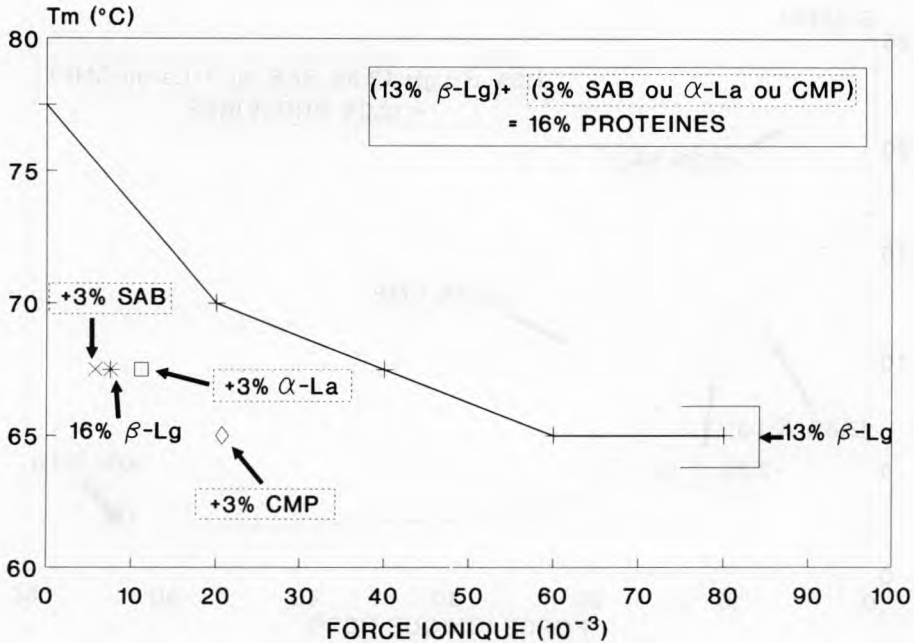


Fig 8. Température minimale de gélfication (T_m) d'une solution à 13% de β -Lg2 et 3% d' α -La, de CMP ou de SAB – pH 8,0, 0,7 °C/min, 0,5 Hz, 2,8% de déformation.

Temperature of the onset of gelation (T_m) for a solution at 13% of β -Lg2 and 3% of α -La, CMP or BSA at pH 8.0, heating rate 0.7 °C/min from 60 to 95 °C, 0.5 Hz, strain 2.8%.

Aptitude individuelle à la thermogélfication de l' α -La, du CMP et de la SAB

Nous avons étudié le G' à 90 °C–30 min de solutions d' α -La, de CMP ou de SAB dans le but de mettre en rapport le comportement thermogélfifiant individuel de ces 3 protéines et l'influence que ces dernières exercent sur la gélfication de la β -Lg.

À une concentration en protéines de 2,3% (pH 4,0) ou 3% (pH 8,0), nous n'avons pas observé d'augmentation significative du G' après traitement thermique.

À une concentration en protéines de 15% (tableau III), les solutions de β -Lg et

Tableau III. Valeur du module élastique (G' en kPa) après un chauffage de 90 °C–30 min de solutions à 15% de protéines à pH 4,0 et 8,0.

Value of elastic modulus (G' in kPa) after a thermal treatment of 90 °C–30 min at 15% protein, pH 4.0 and 8.0.

G' (kPa) (90 °C–30 min)	pH 4,0	pH 8,0
β -Lg	10,7	10,5
α -La	2,7	0
SAB	46	17,6
CMP	?	0,03

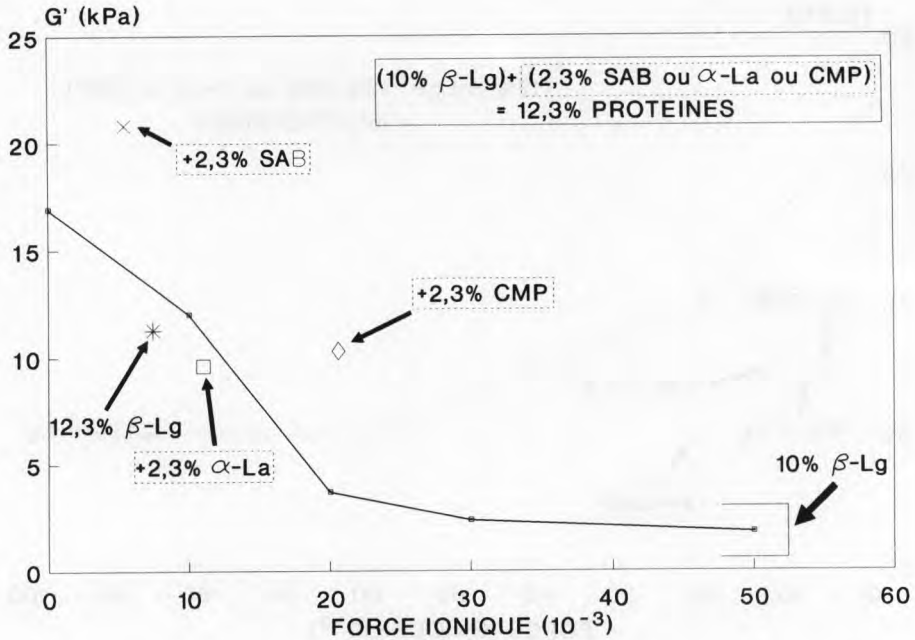


Fig 9. Module élastique (G') à 90 °C–30 min de gels à 10% de β -Lg2 et 2,3% d' α -La, de CMP ou de SAB – pH 4,0, 0,7 °C/min, 0,5 Hz, 2,8% de déformation.

Elastic modulus (G') at 90 °C–30 min for gels at 10% of β -Lg2 and 2.3% of α -La, CMP or BSA at pH 4.0, heating rate 0.7 °C/min, from 60 to 95 °C, 0.5 Hz, strain 2.8%.

de SAB présentent une valeur de G' très élevée après traitement thermique (> 10 kPa), indiquant la formation d'un gel ferme. En revanche, le G' de la solution d' α -La à pH 8,0 n'est toujours pas mesurable après chauffage, tandis qu'à pH 4,0, une faible augmentation du G' a été observée sans pour autant s'accompagner de la formation d'un gel. Enfin, la mesure du G' ne révèle aucune aptitude individuelle du CMP à la thermogélification à pH 8,0; à pH 4,0, la formation d'un gel de CMP a été observée à température ambiante quelques min après l'ajustement du pH de la solution.

DISCUSSION

Gélification de la β -lactoglobuline: influence du pH et de l'environnement ionique

Température minimale de gélification (T_m)

La β -Lg a un pH isoélectrique (pH_i) de 5,2 (Eigel *et al*, 1984). En deçà et au-delà de cette valeur de pH, la charge nette de cette protéine augmente, entraînant une augmentation des forces répulsives inter-

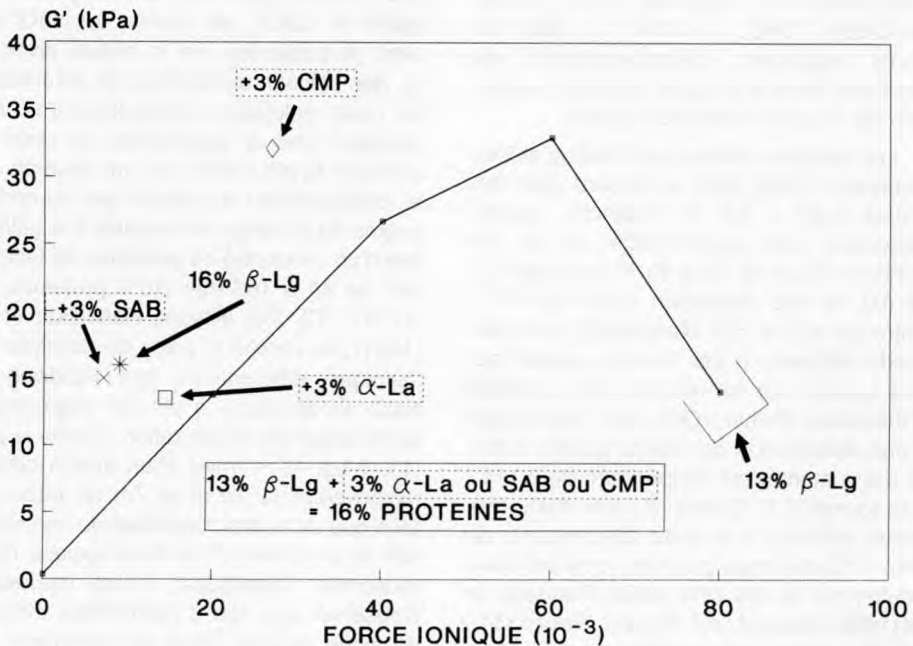


Fig 10. Module élastique (G') à 90 °C-30 min de gels à 13% de β -Lg2 et 3% d' α -La, de CMP ou de SAB – pH 8,0, 0,7 °C/min, 0,5 Hz, 5,7% de déformation.

Elastic modulus (G') at 90 °C-30 min for gels at 13% of β -Lg2 and 3% of α -La, CMP or BSA at pH 8.0; heating rate 0.7 °C/min from 60 to 95 °C, 0.5 Hz, strain 5.7%.

moléculaires. La barrière énergétique que doivent franchir les molécules pour s'agréger s'élève alors et maintient les molécules à distance les unes des autres, prévenant ainsi les interactions entre protéines.

À pH < pHi, l'augmentation de la T_m avec la diminution de pH signifie que pour franchir cette barrière énergétique qui s'oppose à l'agrégation des molécules, l'intensité du traitement thermique doit être plus importante.

À pH > pHi, un phénomène inverse a été observé dans le cas de la β -Lg1 puisque la T_m diminue avec l'élévation de pH. À partir de l'analyse enthalpique différentielle, Harwalkar et Ma (1991) ont montré

que la température de dénaturation de la β -Lg diminue de 84 à 72,6 °C entre pH 5,0 et 10,0 (1% β -Lg, 10 °C/min). Ces résultats suggèrent que l'augmentation des forces de répulsion intramoléculaires consécutive à l'élévation de pH accélère la transconformation des molécules, entraînant par là-même un démasquage de sites impliqués dans l'agrégation des molécules. De plus, à partir de pH 6,0, il est bien établi que la β -Lg présente un changement de conformation (Townend *et al*, 1969), qui se traduit par l'exposition à la surface de la molécule d'un groupement carboxyl, avec libération d'un proton, et du groupement SH libre. Ce dernier présente en outre une

réactivité accrue à partir de pH 6,7 (Dunnill et Green, 1966). La mise en place de ponts disulfures intermoléculaires est peut-être alors à l'origine de cette diminution de T_m avec l'élévation de pH.

Les résultats obtenus par Stading et Hermansson (1990) sont en accord avec les nôtres à pH > 5,5. En revanche, ceux-ci observent une augmentation de la T_m (12% de β -Lg) de 70 à 80 °C entre pH 2,5 et 4,0, et une diminution de 80 à 40 °C entre pH 4,0 et 5,5. Néanmoins, une méthode différente a été mise en œuvre par ces auteurs sur un appareil plus sensible (Rhéomètre Bolhin VOR), avec application d'une déformation de 0,04% (contre 2,8%) et d'une montée en température de 0,1 °C/min (contre 0,7 °C/min). À partir d'une méthode similaire à la nôtre (déformation de 2%, 1 °C/min) mais pour une concentration seulement de 4% (2% NaCl), Paulsson *et al* (1990) trouvent une T_m plus élevée (84–88 °C) et peu dépendante du pH (4,5 à 7,5). En revanche, Paulsson *et al* (1986) ont obtenu à 10% de β -Lg et à pH 6,6 une T_m d'environ 80 °C (1 °C/min), voisine de celle déterminée dans notre étude.

Après déminéralisation par électrodialyse (β -Lg1E), la solution ne gélifie plus à pH 7,0 et 8,0, tandis qu'à pH 9,0, la solution gélifie à partir d'une T_m plus élevée. L'étude de l'influence du NaCl et du CaCl_2 sur la T_m de la β -Lg1E à pH 7,0 a permis d'apporter quelques éléments d'explication. La molécule de β -Lg a une charge nette négative à pH neutre. La présence d'ions positifs tels que le sodium ou le calcium a pour effet de réduire non seulement la hauteur de la barrière énergétique que doivent franchir les molécules pour s'agréger mais également la distance entre les molécules protéiques à partir de laquelle des forces de répulsion intermoléculaires commencent à s'exercer. Ceci peut expliquer qu'une intensité de chauffage moindre soit suffisante pour provoquer l'agréation intermoléculaire lorsque la

force ionique augmente. La plus grande efficacité du CaCl_2 par rapport au NaCl provient probablement de la nature divalente de l'ion calcium qui permettrait la formation de ponts calciques intermoléculaires. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Johns et Ennis (1981) qui ont observé que le remplacement du calcium par du sodium augmente le temps nécessaire à la gélification d'un concentré de protéines de lactosérum de 44 à 166 min (10% protéines, pH 6,7, 70 °C). Par ailleurs, Harwalkar et Ma (1991) ont montré à partir de l'analyse enthalpique différentielle que l'addition de NaCl ou de CaCl_2 à pH 7,0 augmente la température de dénaturation (T_d) de la β -Lg (1% β -Lg, 10 °C/min). Bien que la comparaison entre la T_d et la T_m ne puisse se faire que dans des conditions de concentration en protéines et de force ionique rigoureusement identiques, il est intéressant d'observer que ces 2 paramètres évoluent de façon inverse. Nous en concluons que les sels minéraux retardent le phénomène de dénaturation thermique de la β -Lg, mais accélèrent l'agréation interprotéique. En d'autres termes, en présence de NaCl ou de CaCl_2 à pH 7,0, le réseau de β -Lg se met en place à partir de protéines plus proches de l'état natif qu'en absence de sels minéraux.

En dépit d'un rapport cendres/ β -Lg voisin pour la β -Lg1E et la β -Lg2, cette dernière présente une T_m plus faible à pH neutre, que l'on peut attribuer au rapport Ca/Na 150 fois plus élevé dans le cas de la β -Lg2. Au-dessus de pH 8,0, cette hypothèse n'a plus lieu d'être puisque la T_m de la β -Lg2 devient supérieure à celle de la β -Lg1E. Lors de la préparation de la β -Lg1E, il est possible que l'abaissement du pH à 1,5 ait entraîné une dénaturation partielle des protéines. Si tel est le cas, le taux de dénaturation protéique après traitement thermique de la β -Lg1E est supérieur à celui de la β -Lg2. Or, la dénaturation des protéines globulaires se traduit par une augmentation du volume hydrody-

namique des molécules (Cheftel *et al.*, 1985), et par conséquent des frictions intermoléculaires. Ces dernières, plus importantes dans le cas de la β -Lg1E, peuvent ainsi expliquer les résultats obtenus au-dessus de pH 8,0. En raison de la plus faible hydratation des molécules à pH 7,0 consécutive de la diminution de la charge nette négative, il est probable que ce phénomène n'ait pu être détecté par l'appareillage utilisé. En d'autres termes, la T_m telle que nous l'avons appréhendée reflèterait probablement l'agrégation intermoléculaire à pH neutre et l'augmentation du volume hydrodynamique des molécules au-dessus de pH 8,0.

Structure et fermeté des gels de β -Lg

Par rapport à la fermeté et à l'aspect des gels, l'élévation de la force ionique montre un effet semblable au rapprochement du pH vers le pHi. Cette similarité se traduit en fait par une diminution des forces répulsives intermoléculaires au profit des interactions protéines-protéines. Jusqu'à un niveau critique d'interactions protéines-protéines, la structure des gels se renforce, conduisant alors à l'élévation de la fermeté, qui s'accompagne d'ailleurs d'un changement de structure comme en témoigne l'aspect de plus en plus blanc et opaque des gels. À partir de la microscopie électronique, Mulvihill et Kinsella (1988) et Mulvihill *et al.* (1990) ont montré que ce changement d'aspect correspond à une augmentation de la taille des particules et des pores des gels. La diminution du G' à partir d'un niveau de pH critique qui dépend de la force ionique et de la nature des ions peut être attribuée à cette structure plus ouverte du réseau protéique, qui facilite la circulation de l'eau et son expulsion du gel. Il serait intéressant d'approfondir cette éventuelle relation existant entre ces 2 caractéristiques physiques essentielles du gel, à savoir la rétention d'eau et la fermeté.

Comme pour la T_m , la nature des ions joue un rôle primordial sur la fermeté et l'aspect des gels. Ainsi à pH 7,0, la valeur du G'_{max} et la concentration en sels minéraux optimale correspondante sont très inférieures dans le cas du $CaCl_2$ que dans celui de NaCl. A pH 8,0, Mulvihill et Kinsella (1988) ont curieusement observé que la concentration optimale en $CaCl_2$ (10 mmol/l) engendrait une fermeté, mesurée par la force à 20% de compression des gels, plus élevée que la concentration optimale de 200 mmol/l de NaCl (10% β -Lg, 90 °C-30 min); néanmoins, il est probable que le maximum de fermeté se situe non pas à 200 mmol/l de NaCl, mais entre 100 et 200 mmol/l, zone de concentration en NaCl que ces auteurs n'ont pas étudiée. Enfin, nous observons que les concentrations optimales en sels minéraux définies par Mulvihill et Kinsella (1988) sont supérieures à celles que nous avons obtenues (100 mmol/l de NaCl ou 8,5 mmol/l de $CaCl_2$), probablement en raison des différences de pH mis en œuvre (respectivement 8,0 et 7,0). En effet, les forces répulsives intermoléculaires sont plus importantes à pH 8,0 qu'à pH neutre du fait d'une charge nette négative de la β -Lg plus élevée. Pour atteindre l'équilibre électrostatique permettant d'obtenir la fermeté maximale, une concentration supérieure en contre-ions positifs est donc nécessaire à pH 8,0.

Géification thermique de la β -lactoglobuline en présence des autres protéines de lactosérum

Influence de la SAB

À 2,3% (pH 4,0) ou 3% (pH 8,0) de SAB, cette protéine ne présente pas de propriétés gélifiantes en solution individuelle, alors que Paulsson *et al.* (1986) ont observé la formation d'un gel dès 2% (pH 4,0 et

6,6) mais à partir d'une solution à 1% de NaCl. En revanche, la présence de telles concentrations de SAB dans une solution de β -Lg (10 ou 13%) diminue la T_m et augmente la fermeté des gels obtenus à pH 4,0 ou 8,0, confirmant ainsi les travaux de Paulsson *et al* (1986). Nous pouvons supposer qu'une co-gélfication se produit entre ces 2 protéines. À pH alcalin, la thermo-gélfication en solution individuelle de la SAB et de la β -Lg fait intervenir de façon certaine des ponts SS résultant d'échanges SH/SS (Mulvihill et Kinsella, 1987; Wang et Damodaran, 1990; Matsu-domi *et al*, 1991). Des interactions de ce type pourraient alors s'établir entre ces 2 protéines à pH 8,0. À pH 4,0, les interactions ne peuvent être de type SS en raison de la faible réactivité des groupements SH. De plus, la température élevée (90 °C) à laquelle ont été effectuées les mesures exclut toute participation de liaisons de type hydrogène. Il s'agirait alors probablement d'interactions non covalentes de type Van der Waals, hydrophobe ou/et ionique.

Influence de l' α -La

En dépit des propriétés d'agrégations de l' α -La aux pH voisins de 4,0 entre 55 et 65 °C (Pearce, 1983), cette protéine ne présente pas d'aptitude à la gélfication à une concentration inférieure ou égale à 15%. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Paulsson *et al* (1986) qui n'ont pas observé la formation de gel à 20% d' α -La (pH 4,0 à 6,6) dans des conditions de chauffage proche des nôtres (1 °C/min). La diminution de la T_m de la β -Lg en présence d' α -La peut s'expliquer par des interactions entre ces 2 protéines. Leur existence est d'ailleurs aujourd'hui bien établie (Hunziker et Tarassuk, 1965; Baer *et al*, 1976; Elfagm et Wheelock, 1978; Melo et Hansen, 1978). Bien que la nature de ces interactions soit loin d'être

élucidée, la participation de ponts disulfures résultant d'échanges SH (de la β -Lg) et SS (de l' α -La) à pH alcalin est très probable. Aux 2 pH étudiés (4,0 et 8,0), l'absence d'effet significatif de l'addition d' α -La sur la fermeté des gels de β -Lg signifie que ces éventuelles associations entre ces 2 protéines sont sans conséquence majeure sur la gélfication thermique de la β -Lg.

Influence du CMP

À pH 8,0, nous n'avons observé aucune aptitude à la gélfication du CMP en solution individuelle (3–15%), tandis que la présence de cette protéine exerce un effet positif sur l'aptitude à la gélfication thermique de la β -Lg. À pH 4,0, des observations similaires ont été effectuées avec néanmoins une différence très importante, à savoir la gélfication à température ambiante du CMP (15%) en solution individuelle, déjà observée par Mollé (communication personnelle). Selon Tanimoto *et al* (1990), le CMP est polymérisé à pH > 4,0 (PM 45 kDa) alors qu'à pH < 4,0, il est sous forme de monomère (PM 7–9 kDa). La transconformation qui aurait lieu dans la zone de pH proche de 4,0 serait donc favorable à la gélfication de ce peptide. Les éventuelles interactions thermiques existant entre le CMP et la β -Lg à pH 4,0 et 8,0 ne peuvent être de nature disulfure puisque le CMP est dépourvu de résidus de cystéine. À partir de l'analyse enthalpique différentielle, Imafidon *et al* (1991) ont montré que le variant A de la caséine κ (Cas κ), dont le CMP représente environ le tiers (côté C-terminal, acides aminés 106-169), augmente faiblement la température de dénaturation (T_d) de la β -Lg de 74,9 à 75,2 °C, tandis que le variant B diminue la T_d de 4,5 °C (10 °C/min, pH 6,5, β -Lg/Cas κ = 1). Le segment peptidique (135-150) porteur de la variation génétique serait donc impliqué dans la formation du complexe (Cas κ - β -Lg), et peut-être alors dans les interac-

tions thermiques entre le CMP et la β -Lg. Par ailleurs, Doi *et al* (1981) ont montré que les glucides favorisaient la formation du complexe thermique (Cas κ - β -Lg). De même, Muskal *et al* (1990) ont mis en évidence que la présence de sucre à proximité des résidus de cystéine exerçait un effet positif sur la formation de ponts SS entre la Cas κ et la β -Lg. Nous pouvons alors supposer que le CMP, qui porte les sites de glycosylation de la Cas κ , favorise la mise en place de ponts SS entre les molécules de β -Lg, renforçant ainsi la fermeté des gels.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M Piot pour son assistance technique, ainsi que JL Maubois pour l'aide qu'il nous a apportée dans la rédaction de cette publication.

RÉFÉRENCES

- Alais C (1984) *Science du lait; principes des techniques laitières*. Sepaic, Paris, 4 edn
- Andrews AT, Taylor MD, Owen AJ (1985) Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *J Chromatogr* 348, 177-185
- Baer A, Oroz M, Blanc B (1976) Serological studies on heat-induced interactions of α -lactalbumin and milk proteins. *J Dairy Res* 43, 419-432
- Baumy JJ, Fauquant J (1989) Mise en évidence d' α -lactalbumine glycosylée dans une préparation industrielle d' α -lactalbumine bovine. *Lait* 69, 315-322
- Baumy JJ, Gestin L, Fauquant J, Boyaval E, Maubois JL (1990) Technologie de purification des phospholipides du lactosérum. *Process* 1047, 29-33
- Brulé G, Maubois JL, Fauquant J (1974) Étude de la teneur en éléments minéraux des produits obtenus lors de l'ultrafiltration du lait sur membrane. *Lait* 54, 600-615
- Brulé G, Roger L, Fauquant J, Piot M (1980) Procédé de traitement d'une matière première à base de caséine contenant des phosphocasinates de cations monovalents ou leurs dérivés. Produits obtenus et applications. Brevet français n° 8002281
- Cheffel JC, Cuq JL, Lorient D (1985) *Protéines alimentaires. Propriétés fonctionnelles. Valeur nutritionnelle. Modifications chimiques*. Tech Doc, Lavoisier, Paris
- Doi H, Ibaki F, Kanamori M (1981) Effect of carbohydrate moiety of λ -casein on the complex formation with β -lactoglobulin. *Agric Biol Chem* 45, 2351-2353
- Dunkerley JA, Zadow JG (1984) The effect of calcium and cysteine hydrochloride on the firmness of heat coagula formed from Cheddar whey protein concentrates. *Aust J Dairy Technol* 39, 44-47
- Dunnill P, Green DW (1966) Sulphydryl groups and the N \rightarrow R conformational change in β -lactoglobulin. *J Mol Biol* 15, 147-151
- Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA, Farrel HM Jr, Harwalkar VR, Jenness R, Whitney HR McL (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *J Dairy Sci* 67, 1599-1631
- Elfagm AA, Wheelock JV (1978) Interaction of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin during heating. *J Dairy Sci* 61, 28-32
- Fauquant J, Maubois JL, Pierre A (1988) Microfiltration du lait sur membrane minérale. *Tech Lait Market* 1028, 21-23
- Harwalkar VR, Ma CY (1991) Evaluation of interactions of β -lactoglobulin by differential scanning calorimetry. Symp ASC on Protein Interactions, Atlanta, USA, Avril
- Hiraoka Y, Segawa T, Kuwajima K, Sugai S, Murai N (1980) α -lactalbumin: a calcium metalloprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 95, 1098-1104
- Hunziker HG, Tarassuk NP (1965) Chromatographic evidence for heat-induced-interaction of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *J Dairy Sci* 48, 733-734
- Imafidon GI, Ng-Kwai-Hang KF, Harwalkar VR, Ma CY (1991) Differential scanning calorimetric study of different genetic variants of β -lactoglobulin. *J Dairy Sci* 74, 2416-2422
- Johns JEM, Ennis BM (1981) The effects of the replacement of calcium with sodium ions in

- acid whey on the functional properties of whey protein concentrates. *NZJ Dairy Sci Technol* 16, 79-86
- Kim YA, Chism GW, Mangino ME (1987) Determination of the β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin of whey protein concentrates and their relationship to protein functionality. *J Food Sci* 52, 124-127
- Kinsella JE, Whitehead DM (1989) Proteins in whey: chemical physical and functional properties. In: *Advances in food and nutrition research* (Kinsella JE, ed), Acad Press, San Diego, 33
- Kornhorst A, Mangino M (1985) Prediction of the strength of whey protein gels based on composition. *J Food Sci* 50, 1403-1405
- Kronman MJ, Sinha SK, Brew K (1981) Characteristics of the binding of calcium to bovine α -lactalbumin. *J Biol Chem* 256, 8582-8587
- Kuhn PR, Foegeding EA (1991) Factors influencing whey protein gel rheology: dialysis and calcium chelation. *J Food Sci* 56, 789-791
- Langley KR, Millard D, Evans EW (1986) Determination of tensile strength of gels prepared from fractionated whey proteins. *J Dairy Sci* 53, 285-292
- Matsudomi N, Rector D, Kinsella JE (1991) Gelation of bovine serum albumin and β -lactoglobulin; effects of pH, salts and thiol reagents. *Food Chem* 40, 55-69
- McDonough FE, Hargrove RE, Mattingly WA, Posati LP, Alford JA (1974) Composition and properties of whey protein concentrates from ultrafiltration. *J Dairy Sci* 57, 1438-1443
- Melo TS, Hansen AP (1978) Effect of ultra-high temperature steam injection on model systems of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *J Dairy Sci* 61, 710-713
- Morr CV (1979) Functionality of whey proteins. *NZJ Dairy Sci Technol* 14, 185-194
- Mulvihill DM, Kinsella JE (1987) Gelation characteristics of whey proteins and β -lactoglobulin. *Food Technol* 41, 102-111
- Mulvihill DM, Kinsella JE (1988) Gelation of β -lactoglobulin: effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. *J Food Sci* 53, 231-236
- Mulvihill DM, Rector D, Kinsella JE (1990) Effects of structuring and destructuring anionic ions on the rheological properties of thermally induced β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocoll* 4, 267-276
- Muskal SM, Holbrook SR, Kim SH (1990) Prediction of the disulfide-bonding state of cysteine in proteins. *Prot Eng* 3, 667-672
- Paulsson M, Hegg PO, Castberg HB (1986) Heat-induced gelation of individual whey proteins. A dynamic rheological study. *J Food Sci* 51, 87-90
- Paulsson M, Dejmeek P, Van Vliet T (1990) Rheological properties of heat-induced β -lactoglobulin gels. *J Dairy Sci* 73, 45-53
- Pearce RJ (1983) Thermal separation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin in bovine Cheddar cheese whey. *Aust J Dairy Technol* 38, 144-149
- Pierre A, Fauquant J (1986) Principes pour un procédé industriel de fractionnement des protéines de lactosérum. *Lait* 66, 405-419
- Rowland SJ (1938) The determination of nitrogen distribution in milk. *J Dairy Res* 9, 42-46
- Serres L, Amariglio S, Petransxiene D (1973) *Contrôle de la qualité des produits laitiers*. Direction des services vétérinaires
- Spackman DH, Stein WH, Moore S (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal Chem* 30, 1190-1206
- Stading M, Hermansson AM (1990) Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocoll* 4, 121-135
- Swaigood HE (1982) Chemistry of milk proteins. In: *Developments in dairy chemistry*. 1. (Fox PF, ed) Appl Sci Publ, New York
- Tanimoto M, Kawasaki YVN, Shinmoto H, Dosako S, Tomizawa A (1990) Process for producing κ -casein glycomacropetides. Brevet EP 0 393 850 A2
- Townend R, Herskovits TT, Timasheff SN, Gorbunoff MT (1969) The state of amino acid residues in β -lactoglobulin. *Arch Biochem Biophys* 129, 567-580
- Wang CH, Damodaran S (1990) Thermal gelation of globular proteins: weight-average molecular weight dependence of gel strength. *J Agric Food Chem* 38, 1157-1164