Simon Bourgeois

Élaboration d'un enrobage à base de protéines laitières et de soja empêchant la diffusion d'huile dans les aliments

Mémoire Présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation:

Monique Lacroix Ph.D. Roger Rupanner D.M.V. Marie-Élise Parent Ph.D.

Juin 2003
Institut Armand-Frappier
Université du Québec

Table des matières

Liste des figures et des tableaux	xiii
1- Résumé	1
2- Introduction	2
3- Revue de la littérature	4
3.1- Le chocolat	4
3.2- Les amandes enrobées de chocolat	5
3.3- Les protéines	8
3.4- La réticulation	9
3.4.1- Réticulation par les méthodes physiques	9
Thermocondensation	9
Irradiation	10
3.4.2- Réticulation par les méthodes chimiques	10
3.4.3- Réticulation par les méthodes enzymatiques	12
3.5- Films ou enrobages à base de protéines laitières et végétales	13
3.5.1- Protéines de soja	13
3.5.2- Protéines laitières	13
Caséine	14
Protéines du lactosérum	15
α-lactalbumine	16
β- lactoglobuline	16
3.5.3- Les polysaccharides	17
La cellulose et ses dérivés	17
La pectine	18
L'amidon	19
3.5.4- L'agent plastifiant	20
4- Buts	21
5- Hypothèses et démarche	22
6- Matériels et méthodes	23
6.1- La confection des enrobages	23
6.1.1- La formulation des différents enrobages	23
6.1.2- Les différents traitements des protéines	25
Le chauffage	25
Le traitement chimique	25
Le traitement enzymatique	26
6.2- Analyse structurale des protéines traitées par les méthodes de	
réticulation	27
6.2.1- La chromatographie d'exclusion	27
6.2.2- L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide	28
6.3- Mise au point d'un modèle pour évaluer la diffusion d'huile	29
6.4- Analyse statistique	30

7- Résultats	32
7.1- Étude de la diffusion d'huile pour différentes formulations à base de)
protéines	32
7.1.1- Étude de la diffusion d'huile pour différentes	
concentrations de glycérol	32
7.1.2- Effet du traitement à la chaleur sur le taux de diffusion	36
7.1.3- Effet de l'ajout de carboxyméthylcellulose sur le taux	
de diffusion	39
7.1.4- Effet de l'ajout de pectine sur le taux de diffusion	42
7.1.5- Effet de l'ajout d'amidon sur le taux de diffusion	45
7.1.6- Effet de différentes formes de réticulation sur le taux	
de diffusion	48
7.2- Étude de la réticulation des protéines isolats de protéines de soja	
et caséinate de calcium	52
7.2.1- Étude de la réticulation par électrophorèse sur gel de	
polyacrylamide	52
7.2.1.1- Isolat de protéine de soja	52
7.2.1.2- Caséinate de calcium	53
7.2.2- Étude de la réticulation par chromatographie d'exclusion	54
7.2.2.1- Isolats de protéine de soja	54
7.2.2.2- Caséinate de calcium	55
8- Discussion	59
9- Conclusion	66
10- Bibliographie	67

Liste des figures et des tableaux

Figures

l - Phénomène de la réticulation d'une protéine	p.9
2- Réticulation par la transglutaminase	p.13
3- Structure de la cellulose	p.18
4- Structure de la pectine	p.19
5- Courbe de la diffusion d'huile pour différentes	
concentrations de glycérol	p.35
6- Courbe de la diffusion d'huile pour le traitement à la chaleur	p.38
7- Courbe de la diffusion d'huile en présence de	
carboxyméthylcellulose	p.41
8- Courbe de la diffusion d'huile en présence de pectine	p.44
9- Courbe de la diffusion d'huile en présence d'amidon	p.47
10- Courbe de la diffusion d'huile pour différentes méthodes de	
réticulation	p.51
11- Étude de la réticulation de l'isolat de protéines de soya	
par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	p.52
12- Étude de la réticulation du caséinate de calcium par	_
électrophorèse sur gel de polyacrylamide	p.53
13- Étude de la réticulation de l'isolat de protéines de soya	-
par chromatographie d'exclusion	p.54
14- Étude de la réticulation du caséinate de calcium par	-
chromatographie d'exclusion	p.55
c.m.c.m.v.g.u.p.u.p.u.p.u.p.u.p.u.p.u.p.u.p.u.p.u	-
Tableaux	
I- Composition en acides gras du beurre de cacao et de	
l'amande	p.7
II- Composition des différents extraits protéiques utilisés	F
dans les différentes formulations	p.24
III- Mesure de la diffusion d'huile pour différentes	P
concentrations de glycérol	p.34
IV- Mesure de la diffusion d'huile suite au traitement à la chaleur	p.37
V- Mesure de la diffusion d'huile en présence de	р.с.
carboxyméthylcellulose	p.40
VI- Mesure de la diffusion d'huile en présence de pectine	p.43
VII- Mesure de la diffusion d'huile en présence d'amidon	p. 13
VII- Mesure de la diffusion d'huile pour différentes méthodes de	p. 10
	p.50
réticulation	p.50

1. Résumé

Lorsque le chocolat est utilisé pour enrober des aliments contenant des lipides comme les amandes, l'huile peut diffuser vers l'enrobage. Des enrobages à base de protéines laitières ou de protéines de soja ont été étudiés pour leur capacité à empêcher la diffusion d'huile. Pour étudier la diffusion d'huile, les enrobages sont appliqués sur des cacahuètes qui baignent dans une huile complètement saturée (tricapryline). cacahuètes ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines. La diffusion d'huile a été évaluée par une méthode spectrophotométrique à une longueur d'onde de 234 nm. La présence de glycérol dans la solution d'enrobage à base de l'isolat de protéines de soja ou de caséinate de calcium ne semble pas affecter la diffusion d'huile. L'addition de carboxyméthylcellulose aux enrobages à base d'isolat de protéines de soja et de caséinate de calcium semble être bénéfique. Ce polysaccharide diminue la diffusion de 40 % pour l'isolat de protéines de soja et de 47 % pour le caséinate de calcium par rapport au témoin sans enrobage et de 28 % et de 27 % par rapport aux enrobages sans carboxyméthylcellulose. L'ajout de pectine ne semble pas favorable car il augmente la diffusion de 26 % pour l'enrobage d'isolat de protéines de soja et de 15 % pour l'enrobage à base de caséinate de calcium par rapport aux enrobages sans pectine. La présence d'amidon dans les solutions d'enrobage à base de IPS ou de caséinate de calcium diminue la diffusion de 11 % pour l'isolat de protéines de soja et n'affecte pas La chromatographie d'exclusion et significativement le caséinate de calcium. l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide démontrent que l'isolat de protéines de soja et le caséinate de calcium réticulent faiblement par la chaleur et fortement avec le Une forte réticulation ne signifie pas glutaraldéhyde et la transglutaminase. nécessairement une diminution de la diffusion d'huile. Pour les deux protéines, la réticulation par thermocondensation semble suffisante pour améliorer l'efficacité de l'enrobage.

2. Introduction

Un phénomène particulier provoque la diminution du temps de vie des produits de confection contenant des amandes ou des cacahuètes sur les étalages. Les amandes et les cacahuètes contiennent des lipides qui peuvent migrer sous forme d'huile vers la couche externe (Fennema et al., 1993). Lorsque le chocolat est la couche externe, ce dernier peut devenir mou et collant. De plus, la structure cristalline du chocolat peut changer, et causer un givre de gras. Ce dernier phénomène correspond à la présence d'une couche graisseuse à la surface du chocolat. Finalement, l'enrobage de chocolat peut devenir sec et le produit perd son goût caractéristique (Cakebread, 1972; Beckett, 1990). La quantité d'huile qui va migrer dépend de quelques facteurs dont la sorte et la quantité d'huile dans le centre, la surface interfaciale, finalement le temps et la température d'entreposage (Wootton et al., 1970; Shuleva, 1989). L'absorption et l'incompatibilité des lipides sont les deux plus importants facteurs causant le ramollissement du chocolat . Les lipides fluides comme ceux retrouvés dans l'huile d'amande sont les principaux lipides qui vont migrer (Talbot, 1989). La migration des lipides peut être très rapide à la température de la pièce (17-23°C) (Wacquez, 1975). De plus, le taux de migration s'accélère avec une augmentation de la température (Wootton et al., 1970; Wacquez, 1975). La migration des lipides dans l'enrobage de chocolat se produit surtout durant les premiers temps de l'entreposage, et diminue avec le temps d'entreposage (Wootton et al., 1970; Wacquez, 1975). La migration diminue avec une augmentation de la fraction solide de l'huile.

La durée de vie des produits de confection sur l'étalage peut être prolongée en par l'application d'un film ou d'un enrobage consommable entre le chocolat et le centre contenant des lipides. Une solution constituée de farine, d'eau et de 21% de shortening liquide a été appliquée à un produit rempli de beurre d'arachide pour réduire la migration d'huile (Brabbs, 1986). Une barrière efficace peut être créée à l'aide d'une solution contenant un acide gras ayant un point de fusion élevé, mais cette dernière doit être étendue en une fine couche pour prévenir le goût cireux (Beckett, 1990). Des films secs de cellulose sont efficaces comme barrière lipidique, mais des films de 0.005 mm sont

détectables (Fennema, 1991). Des enrobages contenant de l'amidon hydroxypropylé à 10% et une haute teneur en amylose (70%) de 0.026 mm d'épaisseur sont efficaces contre la migration des lipides (Jokay et *al.*, 1967). Finalement, l'utilisation d'un glaçage de confiseur comme scellant (permettant de boucher les trous) peut aider à l'inhibition du transfert des lipides vers le chocolat (Minson, 1990).

Dans ce contexte, le but du présent projet était de préparer une solution d'enrobage consommable, semi-solide qui répond aux exigences suivantes. D'abord, la solution d'enrobage doit être une barrière efficace contre la migration des lipides. Ensuite, elle ne doit pas changer les propriétés sensorielles du produit altéré. L'activité de l'eau doit être semblable aux composants majeurs du produit. La viscosité doit être assez basse pour une application facile, mais assez haute pour résister au mouvement. Il doit adhérer facilement au chocolat et ne doit pas craquer ou développer des caractéristiques sensorielles indésirables durant l'entreposage. Finalement, il doit être faisable à grande échelle.

3. Revue de la littérature

3.1. Le chocolat

Le composant majeur du chocolat dérive de la graine de cacao (Minifie, 1980). En fait, le chocolat est obtenu par le mélange de grains de cacao, de masse de cacao, de poudre de cacao et de sucrose avec ou sans beurre de cacao. Le chocolat nature doit contenir au moins 35 % de solides de cacao secs, au moins 14 % de solides de cacao secs non-gras et 18 % de beurre de cacao. Le chocolat au lait se caractérise par un minimum de 25 % de solides de cacao secs incluant 2.5 % non-gras, au moins 14 % de solides du lait incluant 3.5 % de matière grasse, au moins 25 % de gras et pas plus de 55 % de sucrose. Le chocolat est une dispersion de sucres, protéines et particules de cacao dans une phase continue de gras (Minifie, 1980; Beckett, 1994).

La conception du chocolat se fait en plusieurs étapes : fermentation des grains de cacao et rôtissage, séparation de l'enveloppe du grain du cacao, pression sur le grain de cacao pour obtenir le beurre de cacao, mélange du cacao et des autres composants du chocolat, tempérage du chocolat pour obtenir les cristaux appropriés et moulage du chocolat (Minifie, 1980). Le tempérage est l'étape cruciale de la fabrication du chocolat. Le tempérage est composé de trois étapes : chauffage du chocolat à 45°C pour éliminer le maximum de formes instables du beurre de cacao, refroidissement à 26°C et élévation de la température à 29°C (Minifie, 1980). La nécessité du tempérage du chocolat provient du comportement polymorphique complexe du beurre de cacao. Six polymorphes (I – VI) différents ont été dénombrés (Larsson, 1994; Sato, 1996). Les formes les plus stables sont les formes V et VI qui sont des polymorphes de type β (Larsson, 1994; Sato, 1996). Les produits du chocolat qui ont un comportement stable face au changement de température et qui sont en mesure de conserver une belle texture sont produits lorsque le tempérage du chocolat a été fait et que les formes les plus stables du beurre de cacao sont présentes.

Le beurre de cacao est composé principalement des acides gras suivants : acide stéarique (St), acide palmitique (P) et acide oléique (O). Ces acides gras forment trois triglycérides dans le beurre de cacao : POP, POSt et StOSt (Cebula et al., 1991; Okawachi et al., 1985). Le comportement à la chaleur du beurre de cacao dépend de la teneur en triglycérides (Yano et al., 1993). Si une grande quantité de POP est présente, le beurre de cacao sera moins stable à la chaleur. Si une grande quantité de StOSt est présente, le beurre est plus stable à la chaleur. Ceci s'explique par un point de fusion plus élevé de l'acide stéarique par rapport à l'acide palmitique.

Le chocolat au lait a une composition en matières grasses différente de celle du chocolat nature par l'addition de gras solides qui contiennent les gras du lait. La présence des matières grasses du lait dans le chocolat influence la stabilité polymorphique des matières grasses du beurre de cacao (Timms, 1980). Les matières grasses du lait sont principalement liquides à la température de la pièce et agissent comme solvant amenant ainsi une chute du point de fusion du beurre de cacao (Timms, 1980; Peterssen, 1986). Ce phénomène explique la texture plus molle du chocolat au lait.

3.2. Les amandes enrobées de chocolat

L'amande et la cacahuète sont des produits enrobés par le chocolat. Ces produits se conservent difficilement à la température de la pièce. Ce phénomène serait causé par une diffusion d'huile provenant de l'amande ou la cacahuète vers l'enrobage de chocolat (Fennema, 1991). Ceci s'explique par une teneur assez forte en acides gras insaturés de l'amande. Les acides gras insaturés ont un point de fusion plus faible que les acides gras saturés et sont sous forme liquide à la température de la pièce. Le beurre de cacao, lui, a une forte teneur en acides gras saturés et est sous forme solide à la température de la pièce (Yano et *al.*, 1993). La quantité d'huile qui migre dépend du noyau, de l'aire interfaciale, du temps d'entreposage et de la température d'entreposage (Wootton et *al.*, 1970; Shuleva, 1989). La diffusion peut se produire à une vitesse assez rapide à la température de la pièce et s'accélère lorsque la température augmente. Il a été démontré

que la migration des lipides pour des biscuits enrobés de chocolat se produit rapidement au début de l'entreposage et diminue avec le temps d'entreposage (Wootton et *al.*, 1970; Wacquez, 1975). Le tableau I démontre la composition en acides gras du beurre de cacao et de l'amande.

Lorsque l'huile d'amande s'introduit dans l'enrobage de chocolat, les cristaux stables de la forme stable du beurre de cacao sont déstabilisés (Lovegren et al., 1976). L'huile de cacahuète induit une baisse de la quantité de gras solides dans le chocolat et abaisse ainsi le point de fusion des cristaux (Lovegren et al., 1976). Cette migration de l'huile d'amande cause différents phénomènes non souhaités : ramollissement de l'enrobage de chocolat, durcissement de l'amande par la perte d'huile, perte de la différence perçue entre l'enrobage et le noyau et formation d'une bulle d'huile à la surface de l'enrobage (Campbell et al., 1968). L'enrobage se ramollit à cause de la dilution du beurre de cacao par l'huile d'amande. Ce phénomène est accru lorsque les gras qui diffusent dans l'enrobage sont incompatibles avec le beurre de cacao. L'huile d'amande peut se retrouver à la surface de l'enrobage et former une couche. De plus, la présence d'huile à la surface du chocolat peut faciliter l'oxydation des acides gras insaturés, surtout l'acide linoléique (Padley, 1994).

Tableau I. Composition en acides gras du beurre de cacao et de l'huile d'amande

Acides gras	Beurre de cacao	Huile d'amande
Saturés	60 %	8.2 %
Myristique	0.1	6.5
Palmitique	25.4	1.7
Stéarique	33.2	-
Monoinsaturés	32.9 %	69.9 %
Palmitoléique	0.2	0.6
Oléique	32.6	69.4
Polyinsaturés	3.0 %	17.4 %
Linoléique	2.8	17.4
Linolénique	0.1	-

Il existe différentes solutions pour contourner le problème de la migration d'huile: l'entreposage à une température plus faible, l'utilisation d'une couche plus épaisse de chocolat, l'utilisation d'amandes ayant des gras structurés compatibles avec les gras du chocolat (Beckett, 1990; Nakano, 1989) et l'insertion d'un enrobage ou film entre le noyau et l'enrobage de chocolat (Fennema, 1991). Il est difficile de conserver une température suffisamment basse lors de la distribution du produit (Wacquez, 1975). Une couche épaisse de chocolat donne un produit beaucoup plus coûteux et change les propriétés du produit (Beckett, 1990). L'utilisation de gras structurés devrait diminuer le ramollissement de l'enrobage de chocolat mais ne diminuera pas la diffusion d'huile et cette addition amènerait une augmentation du coût. Une autre solution est d'appliquer un enrobage ou un film entre l'amande et l'enrobage de chocolat. Des films à base de dérivés de cellulose ont été appliqués entre le noyau et l'enrobage. Ces films ont empêché la diffusion d'huile mais changeaient les caractéristiques sensorielles du produit (Fennema, 1991).

Le film ou l'enrobage doit répondre à certaines exigences. Il doit empêcher la diffusion d'huile entre le noyau et l'enrobage. Il ne doit pas changer les caractéristiques sensorielles du produit. Il doit adhérer facilement au noyau et à l'enrobage et ne pas craquer durant l'entreposage. Finalement, il doit être composé de produits comestibles. Un enrobage à base de protéines laitières ou de soja pourrait être intéressant pour les raisons suivantes : bonnes propriétés filmogènes, films manipulables et flexibles, hydrophiles, accessibles et économiques, goût neutre et bonne capacité de réticulation.

3.3. Les protéines

Le développement des films ou d'enrobages à base de protéines d'origine animale ou végétale a démontré des effets prometteurs pour l'industrie alimentaire. Effectivement, ils possèdent des propriétés mécaniques satisfaisantes (Peyron, 1991), des capacités de protection et de préservation en raison de leur pouvoir antioxydant important. Plusieurs études ont démontré que les protéines ont des propriétés filmogènes (Kester et Fennema, 1986). Cette capacité est principalement due à la grande facilité à former des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes ou électrostatiques et d'autres liens faibles. Néanmoins, un processus de condensation polymérisante ou réticulation des protéines est nécessaire pour obtenir un film manipulable et flexible (Avena-Bustillos et Krochta, 1993). De plus, la réticulation des protéines permet d'améliorer les propriétés rhéologiques du film ou enrobage, notamment la barrière de perméabilité (Yildrim et al., 1997). Le phénomène de la réticulation d'une protéine est illustré dans la figure 1. Trois méthodes ont été mises au point pour la réticulation des protéines : physique, chimique et enzymatique.

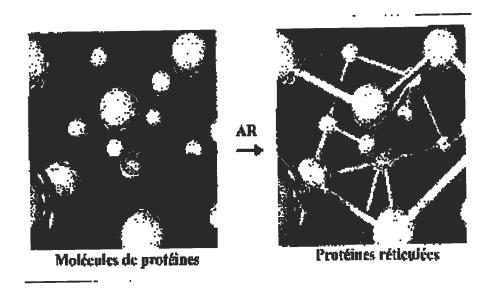


Figure 1. Phénomène de la réticulation d'une protéine

3.4. La réticulation

3.4.1. La réticulation par les méthodes physiques

Les méthodes physiques sont les plus utilisées car elles sont rapides, faciles à procéder et surtout peu coûteuses. Ces traitements physiques permettent d'augmenter la force cohésive des protéines via la formation de ponts intermoléculaires (Singh, 1994). Les deux méthodes les plus connues sont la thermocondensation et l'irradiation.

La thermocondensation

La thermocondensation est un phénomène d'oxydation des groupements sulfhydryles (groupement thiol des résidus cystéine). Le principe consiste à former des liaisons intermoléculaires de type disulfure à l'aide de la chaleur à des températures situées entre 75 et 100°C (McHugh, 1994). Durant le processus de thermocondensation,

la chaleur permet de linéariser les protéines pour que les groupements thiol intraglobulaires soient exposés à l'extérieur de la molécule favorisant ainsi la formation de nouveaux ponts.

L'irradiation

Il est aussi possible de réticuler les protéines par irradiation. Les deux sources d'irradiation les plus utilisées sont le rayonnement UV (220 – 300 nm) et le rayonnement gamma du CO^{60} . Peu importe la source de rayonnement, l'irradiation permet de créer des ponts intermoléculaires dont les plus importants sont de type bityrosine (Ressouany et al., 1998).

3.4.2. La réticulation par les méthodes chimiques

Actuellement, l'utilisation des agents chimiques pour réticuler les protéines dans le but de produire des biofilms n'est pas très développée en raison de plusieurs inconvénients. Le choix de ces agents est très délicat dans un contexte alimentaire car ces agents sont généralement irritants, toxiques, voire même pour certains, cancérigènes. Parallèlement, plusieurs réactions de réticulation libèrent des sous-produits (produits secondaires) pouvant être nocifs. Par ailleurs, la quantité autorisée, la nécessité d'employer des solvants due à la solubilité des réticulants, l'influence de l'eau ou les réactions croisées peuvent également être considérées comme des facteurs limitants.

Néanmoins, quelques agents chimiques sont déjà autorisés pour une utilisation à petite échelle. Parmi ceux-ci, les plus importants sont le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide et les aldéhydes (formaldéhyde, glycéraldéhyde et glutaraldéhyde).

1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide ou EDC

La méthode de réticulation des protéines par les carbodiimides est constituée de deux étapes. Dans la première étape, les groupements carboxyliques des protéines sont activés à l'aide d'un carbodiimide soluble dans l'eau tel que l'EDC. Dans la deuxième étape, ces groupements activés deviennent la cible d'attaque par des groupements nucléophiles tel que les groupements amine des résidus lysine.

Formaldéhyde

Le formaldéhyde est un des premiers agents chimiques ayant été utilisé pour réticuler les protéines. Il a été appliqué pour la première fois en 1890 pour fabriquer les protéines plastiques sous le nom Galalith. Cette molécule est un gaz dont la solution commerciale porte le nom de formaline ou de formol renfermant 37% d'aldéhyde. Utilisé comme agent réticulant, le formaldéhyde agit avec les groupements aminés libres des protéines en deux étapes dont la première conduit à la formation d'un composé méthylol et la suivante à la réticulation. Le formaldéhyde est donc capable de réagir comme les agents bifonctionnels malgré qu'il ne soit qu'un dialdéhyde.

Glycéraldéhyde

Acharya et al. (1988) ont étudié la réticulation des protéines par le glycéraldéhyde. La réaction est caractérisée dans un premier temps par la formation d'une base de Schiff entre une fonction aldéhyde et un groupement amine des protéines. Toutefois, cette structure n'est pas stable et est regénérée par la suite par une fonction carbonyle via le réarrangement d'Amadori. Dans un deuxième temps, la réticulation a lieu lors de la formation d'un céto-amine.

Glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde est l'agent homobifonctionnel le plus utilisé parmi les aldéhydes tels que le glyoxal, malondialdéhyde, le succinialdéhyde et l'adipaldéhyde. La réaction avec le glutaraldéhyde se traduit par la formation d'une base de Schiff mais le produit formé est irréversible (Hajdu et Friedrich, 1975). Le glutaraldéhyde se retrouve sous forme polymérisée en solution à pH acide, ce qui est causé par les hémiacétals cycliques et, en solution à pH basique, où les polymères d'aldéhyde insaturés sont formés. C'est au niveau de ces sites insaturés qu'attaquent les groupements aminés des protéines pour conduire à la réticulation. Il est important de noter que les autres groupes fonctionnels des protéines tel que thiol, imidazole et hydroxyle peuvent aussi être impliqués dans le phénomène de réticulation par le glutaraldéhyde.

3.4.3. La réticulation par les méthodes enzymatiques

De nombreuses enzymes ont été utilisées pour réticuler les protéines. La plus importante est la transglutaminase. Cette enzyme est largement distribuée dans la nature. Il y a deux sortes de transglutaminase : celle d'origine animale, qui est dépendante d'un apport en calcium, et celle d'origine microbienne, qui elle est indépendante du calcium. Dans les deux cas, elles catalysent la formation d'un lien covalent ε-(γ-glutamyl)lysyl entre un groupement γ-carboxyamide (résidus glutamine) et un groupement d'amine primaire (résidus lysine) (fig. 2) (Folk et Chung, 1973) (figure 2). La transglutaminase est largement utilisée dans l'industrie alimentaire afin d'améliorer les propriétés physiques des aliments par l'amélioration de l'intégrité des aliments suite à la cuisson ou d'enrichir la qualité nutritive par l'introduction de résidus lysines dans les protéines alimentaires (Whitaker, 1977). Du point de vue de la fabrication des biofilms, cette enzyme permet également d'obtenir des résultats fort intéressants. Cependant, son coût trop élevé constitue un obstacle pour la production de biofilms.

Figure 2. Réticulation par la transglutaminase

3.5. Films ou enrobages à base de protéines laitières et végétales

L'utilisation des protéines laitières et végétales comme le soja rendent l'application d'un enrobage plus intéressante par leur faible coût.

3.5.1. Les protéines de soja

Les protéines de soja sont des molécules hétéropolymères composées de quatre sous-unités : 2S, 7S, 11S et 15S. Le poids moléculaire de ces sous-unités varie entre 300 000 et 600 000 Da. Les films à base de protéines de soja sont facilement réalisables par traitement thermique (Wu et Bates, 1972). Gennadios et al. (1998) ont utilisé les rayons ultraviolets pour réticuler les protéines de soja et ont démontré que ce processus permet d'améliorer les propriétés mécaniques du film.

3.5.2. Les protéines laitières

Les protéines laitières sont les protéines animales les plus anciennement et les plus largement consommées par l'homme (Cheftel, 1985). La teneur moyenne d'un lait normal est d'environ de 3.2 % de protéines dont 80 % est constitué de caséines. Habituellement, les caséines sont isolables par précipitation isoélectrique à pH 4.6 en raison de leur structure moléculaire. La fraction non sédimentable qui correspond aux

protéines solubles est désignée comme "protéines du lactosérum". Ces protéines sont constituées majoritairement de protéines globulaires telles que l' α - lactalbumine, la β - lactoglobuline et les immunoglobulines.

La caséine

La caséine du lait se retrouve sous forme de phospho-caséinate de calcium. La coagulation enzymatique de la caséine provoque une rupture de la micelle et donne du phospho-paracaséinate de calcium. Des études portant sur la mobilité moléculaire ont mis en évidence l'hétérogénéité de la caséine. Il y a cinq familles de caséines : les caséines $\alpha_s 1$ dont le poids moléculaire est environ de 23 600 Da, la caséine $\alpha_s 2$, d'un poids d'environ 25 150 Da, la caséine β , d'un poids d'environ 24 000 Da, la caséine κ , d'un poids d'environ 19 000 Da, et la caséine γ , d'un poids moléculaire d'environ 30 650 Da.

Les caséines α sont plus riches en phosphore et représentent environ 50-55 % des caséines totales. Elles sont aussi riches en groupements acides libres. Le point isoélectrique de ces caséines se situe à 4.1.

Les caséines β représentent 30-35 % des caséines et elles sont solubles à de faibles températures (2°C). Elles contiennent moins de phosphore mais sont plus riches en soufre que les caséines α . Leur point isoélectrique est situé à un pH de 4.9.

Les caséines κ représentent 15 % des caséines. Elles sont pauvres en phosphore et parfois plus riches en segments glucidiques. Elles constituent le substrat spécifique de l'action protéolytique de la présure.

Les caséines γ , qui représentent seulement 5 % des caséines, sont les plus hétérogènes des fractions caséiques. Il a été suggéré que ces caséines dérivent soit de la protéolyse endogène, soit des segments précurseurs de la biosynthèse des caséines β .

Les caséines existent dans le lait sous deux états : l'état réticulé en micelles sphériques de 30-300 nm de diamètre et l'état monomère qui est soluble. Les caséines β et κ se présentent généralement sous forme de complexes micellaires. Les molécules seraient reliées entre elles par de multiples ponts phosphate de calcium.

Les caséines constituent une excellente base pour l'élaboration des biofilms. Brault et al. (1997) ont développé la méthode de réticulation des caséines à l'aide de l'irradiation. Cette méthode a permis d'obtenir des biofilms ayant de meilleures propriétés mécaniques. Ils ont également démontré que l'irradiation en présence de glycérol permet d'augmenter le processus de formation des composés bityrosine. Motoki et al. (1987) ont réticulé la caséine par la transglutaminase et aussi démontré que l'enzyme catalysait la formation de liens covalents. En général, les biofilms à bases de caséinate possèdent les propriétés mécaniques satisfaisantes pour être utilisés comme emballage.

Les protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum sont des sous-produits laitiers qui sont rejetés au cours de la fabrication fromagère. Ils représentent 20 % des protéines dans le lait. Les constituants majeurs sont l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline. Ils contiennent également de l'albumine de sérum de bovin, des immunoglobulines et des protéoses-peptones mais ces dernières en quantité négligeable. Ces protéines sont thermosensibles et sont dénaturées à des températures supérieures aux traitements de pasteurisation (60 – 90°C).

La production des protéines du lactosérum isolées est effectuée par une diafiltration et suivie par une chromatographie à échangeuse d'ions (Wong, 1996). Ce processus permet d'obtenir une quantité de protéines importantes.

Les protéines du lactosérum ont des propriétés filmogènes dues à leur capacité à former des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes ou électrostatiques. Les films obtenus ont une apparence transparente et des propriétés mécaniques acceptables. Ces films sont facilement cassables par conséquent, le processus de réticulation de ces protéines est nécessaire pour obtenir un film manipulable et flexible (McHugh, 1994). Les protéines isolées fournissent toujours de bons films ayant de meilleures propriétés mécaniques par rapport aux protéines du lactosérum concentrées qui sont le fruit de la diafiltration seule. Généralement, les biofilms à base de protéines du lactosérum obtenus par thermocondensation semblent offrir les meilleures propriétés mécaniques et une excellente barrière à l'oxygène (McHugh, 1994). La réticulation de ces protéines par la transglutaminase a été démontrée par Mamoud et Savello (1992) et une amélioration nette des propriétés mécaniques a été décelée.

α- lactalbumine

L'α- lactalbumine représente environ 20 % des protéines du lactosérum et son poids moléculaire se situe autour de 14 000 Da. Cette protéine est composée de 123 acides aminés ayant quatre liens disulfure intermoléculaires sans aucun groupement libre. Cette protéine a une affinité aux ions de calcium. Le calcium contribue à stabiliser la structure conformationnelle de la protéine (Bernal, 1987). En absence de calcium, la protéine devient sensible à la chaleur et est inapte à reprendre sa conformation initiale.

β-lactoglobuline

La β-lactoglobuline est la protéine majeure et représente environ 60 % des protéines du lactosérum. C'est une protéine globulaire de 162 résidus d'acides aminés ayant des groupements hydrophobes et sulfhydryles localisés à l'intérieur de la protéine. Le poids moléculaire de cette protéine est de 18 300 Da. La température de dénaturation de cette protéine est à environ 65°C. Cette dénaturation est accompagnée par les conformations transitionnelles qui exposent les groupements hautement réactifs, notamment le thiol et la ε-amine (Kinsella, 1985).

3.5.3. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont les polymères les plus utilisés pour produire des films ou des enrobages étant donnée leur capacité à former des gels stables et suffisamment rigides (Nisperos-Carriedo, 1994). Ces polymères sont aptes à préserver la qualité sensorielle des aliments, de limiter le rancissement des denrées sensibles, d'empêcher la migration des matières grasses et pour certains de ces polysaccharides, de jouer le rôle d'un agent antimicrobien (Krochta et De Mulder-Johnston, 1997). Le caractère hydrophile de ces polymères limite leur domaine d'application mais, pour cette étude, représente une caractéristique souhaitée.

La cellulose et ses dérivés

La cellulose est la constituante qui assure la protection et le soutien dans les organismes végétaux. Elle se situe dans la membrane cytoplasmique des cellules et est la substance organique la plus abondante dans la nature. La cellulose est un homopolysaccharide poly-β-glucopyranoside aliphatique lié au niveau du carbone 4 par une liaison glycosidique contenant environ 3000 unités monomères et présentant un masse molaire de près de 500 000 Da. Les chaînes de cellulose ont tendance à s'aligner entre elles et sont connectées par de nombreuses liaisons hydrogène (Figure 3). La capacité de former une grande quantité de liaisons hydrogène se reflète sur la structure extrêmement rigide de la cellulose (Kondo, 1998).

Figure 3. Structure de la cellulose

La cellophane, une forme de cellulose thermodurcissable, est un des biofilms ou emballages transparents ayant les meilleures propriétés mécaniques.

Les dérivés de la cellulose donnent des molécules plus facilement maniables car ils sont solubles dans l'eau. Les esters de cellulose en sont un exemple. Les plus importants sont la méthylcellulose (MC), l'hydroxypropylcellulose (HPC) et la carboxyméthylcellulose (CMC). Ces dérivés de la cellulose peuvent être respectivement obtenus par l'action du chlorure de méthyle, de l'épichlorydrine et du monoacétate de sodium sur l'alcali-cellulose. Les films ou les enrobages à base de ces polymères sont réalisés à partir de solutions aqueuses ou de mélanges eau-éthanol. Ils ont une apparence transparente, sont flexibles, et résistent à l'absorption des matières grasses. Des biofilms à base de ces polymères ont déjà été mis sur le marché par les compagnies The Dow Chemical Co. (Midland, Michigan) et Watson Food (West Haven, Connecticut).

La pectine

La pectine est un polysaccharide dont l'unité répétitive est l'acide D-galacturonique. Des liens α (1 \rightarrow 4) unissent les unités d'acide D-galacturonique (Figure 4). Elle consiste en une association de deux -oses complexes : l'acide galacturonique et l'arabogalactane. Ce polymère se retrouve principalement dans les membranes cellulaires et les matières intercellulaires des plantes. Elle est particulièrement abondante

dans les fruits. Lors du mûrissement, la pectine se dégrade et donne une texture douce au fruit.

Figure 4. Structure de la pectine

La pectine a une faible teneur en groupements méthoxyles (par désestérification) et peut former un gel stable et rigide en présence d'ions de calcium. Cette propriété de la pectine est intéressante au point de vue de la fabrication des biofilms ou enrobages. Les films ou les enrobages à base de pectine jouent un rôle important dans l'empêchement de la perte d'eau des aliments et dans la migration des matières grasses comestibles (Krochta et De Mulder-Johnston, 1997).

L'amidon

L'amidon est un polyglucose comportant des liaisons acétaliques α. Les principales sources d'amidon sont le maïs, la pomme de terre, le blé et le riz. Ce polymère contient deux constituantes principales : l'amylose (20 %) et l'amylopectine (80 %).

L'amylose contient quelques centaines d'unité de glucose par molécule dont la masse molaire varie entre 150 000 et 600 000 Da. Ce composant de l'amidon présente une structure différente de celle de la cellulose, malgré le fait que les deux polymères

soient non ramifiés. La différence se situe au niveau des carbones anomériques qui poussent la molécule d'amylose à adopter un arrangement polymérique hélicoïdal.

L'amylopectine est une chaîne ramifiée qui présente un branchement au départ du carbone 6 à environ toutes les vingt à vingt-cinq unités de glucose. La masse molaire de cette autre composante de l'amidon est de l'ordre du million.

L'amidon est largement utilisé dans l'industrie alimentaire dû à son faible coût et ses propriétés fonctionnelles. Les emballages de ce polymère sont assez rigides, opaques et sensibles à l'eau. Des films à base de ce polymère ont été développés par la compagnie Warner-Lambert (USA) sous le nom de Novon.

3.5.4. L'agent plastifiant

Le glycérol est un agent plastifiant ayant des groupements hydroxyles. Ces petites molécules de nature hydrophile peuvent s'intercaler entre les chaînes protéiques en diminuant les interactions intermoléculaires, permettant ainsi d'augmenter la flexibilité, l'élasticité et la résistance au stress du film (Gontard et al., 1993). De plus, ce polyol est fortement utilisé dans l'industrie alimentaire. Une grande concentration de glycérol permettra de réduire la quantité d'eau libre dans la solution d'enrobage par la formation de ponts hydrogène avec les molécules d'eau. L'eau de la solution d'enrobage, lorsque les arachides sont trempés, est fortement absorbée par ces derniers et les amollit grandement changeant ainsi les caractéristiques sensorielles. Afin de résoudre ce problème, la concentration de glycérol a été augmentée par rapport à la solution de Ressouany (1997).

4. <u>Buts</u>

Créer une solution d'enrobage à base de protéines qui est imperméable aux lipides, de vérifier l'adhésion de la solution d'enrobage au chocolat et à l'amande, et finalement, de vérifier la viscosité de la solution d'enrobage.

5. Hypothèses et démarche

Les hypothèses sont les suivantes : 1- La mise au point d'une solution à base de protéines et de polysaccharides permettrait de diminuer la diffusion d'huile. 2- La réticulation des protéines de cette solution d'enrobage permettrait d'optimiser la résistance à la diffusion d'huile.

À cette fin, nous proposons de mettre au point un modèle de la diffusion d'huile, de mettre au point trois méthodes de réticulation des protéines et d'évaluer le taux de diffusion des enrobages.

Or, le modèle mis au point pour l'étude de la diffusion d'huile consiste à laisser baigner les cacahuètes dans une bouteille contenant une huile complètement saturée (tricapryline). Les bouteilles contenant les cacahuètes et l'huile sont entreposées pendant 3, 6, 9 et 12 semaines à 30°C (Fennema, 1993). Quant à la diffusion d'huile d'arachide, elle est évaluée selon la méthode de l'AOAC (1984) qui utilise la lipoxygénase qui catalyse l'oxydation des acides gras insaturés pour former un produit ayant une insaturation conjuguée. Ce produit est détecté par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 234 nm. Finalement, la réticulation des protéines par les méthodes physiques (thermocondensation), chimiques (glutaraldéhyde) et enzymatiques (transglutaminase) est mise en évidence par la chromatographie d'exclusion (Le Tien, 2000) et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) (Le Tien, 2000).

6. Matériel et Méthodes

6.1. La confection des enrobages

6.1.1. La formulation des différents enrobages

La formulation établie par Ressouany (1997) a servi de modèle pour la confection des différents enrobages. Cette formulation est composée de 5% p/p de caséinate de calcium (New Zealand Milk Products, Inc., CA, USA) solubilisé dans l'eau distillée sous agitation, de 2.5% p/p de glycérol (Laboratoire Mat, Québec, Canada) et de 0.25% p/p de carboxyméthylcellulose de sodium à basse viscosité (50-200 cps, Sigma, St. Louis, MO, USA). Finalement, cette solution est chauffée à 60°C pendant 30 minutes pour en assurer l'homogénéité.

À partir de ce modèle établi dans les laboratoires du Dr. Lacroix (Ressouany, 1997), plusieurs modifications ont été effectuées pour améliorer le rendement de l'enrobage face à la diffusion d'huile. Dans un premier temps, trois protéines différentes ont été mises à l'essai : caséinate de calcium (New Zealand Milk Products, Inc., CA, USA), isolat de protéine de soja (Supro 500E, Dupont, Wilmington, DE, USA) et isolat de protéine du lactosérum (BiPRO, Davisco, Eden Prairie, MN, USA). La composition des trois protéines est présentée au tableau II. Dans un deuxième temps, deux concentrations de glycérol (10%, 20%) ont été testées. Dans un troisième temps, trois concentrations (0.25%, 0.5%, 1%) de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne (400-800 cps, Sigma, St. Louis, MO, USA) ont été étudiées. Finalement, deux autres polysaccharides ont été additionnés au mélange : pectine (pommes, Sigma, St. Louis, MO, USA) et amidon (patates, Sigma, St. Louis, MO, USA).

Tableau II. Composition des trois extraits protéiques utilisés dans les différentes formulations.

Composants	Isolat de protéine de soja (IPS)	Isolat de protéine du lactosérum (IPL)	Caséinate de calcium
Protéines (N x 6.38) (%)	90.0	95.0 ≥	93.0 ≥
Matières grasses (%)	5.0	1.0 ≤	1.5 ≤
Cendres (%)	5.0	3.0 ≤	4.5 ≤
Lactose (%)	-	1.0 ≤	0.3 ≤

6.1.2. Les différents traitements des protéines

Le chauffage

Trois solutions aqueuses composées respectivement de 5% de caséinate de calcium, de 5% d'isolats de protéine de soja ou de 5% d'isolats de protéine du lactosérum sont chauffées à une température permettant le déploiement de la protéine. Ces températures ont respectivement été établies à 90°C pour le caséinate de calcium, à 90°C pour les isolats de protéine de soja (German, 1982) et à 80°C pour les isolats de protéine du lactosérum (McHugh et al., 1994). Le temps de chauffage a été établi à environ 30 minutes. Les différentes solutions sont chauffées à l'aide d'une plaque chauffante (Cornell) sous agitation à vitesse moyenne. Lorsque le traitement est terminé, la température est diminuée rapidement à la température ambiante (20 ± 1°C) à l'aide d'un bain de glace durant environ 30 minutes. Suite au traitement, le carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne à une concentration de 0.5% et les autres polysaccharides (pectine ou amidon) à une concentration de 0.25% sont ajoutés. Finalement, le glycérol à une concentration de 10 ou 20% est ajouté et ce, toujours sous agitation à vitesse moyenne. L'addition de différents polysaccharides permet de faire un réseau plus dense avec les protéines tandis que le glycérol diminue la rigidité de l'enrobage (Vachon, 2000). Le pH des différentes solutions a été observé et se situe près du pH neutre.

Le traitement chimique

Le traitement chimique est caractérisé par l'ajout d'un agent permettant d'établir une liaison entre les protéines. Cet agent est le glutaraldéhyde (solution aqueuse de 25%, grade II, Sigma, St. Louis, MO, USA). Une fois les protéines à une concentration de 5% traitées à la chaleur, la température est abaissée à 50°C (température optimale observée en SDS-PAGE) pour accélérer l'effet de l'agent chimique. Le pH est stabilisé à 7.0 avec NaOH 1.0M et le temps de réaction optimal est de 30 minutes (optimiser avec SDS-

PAGE). Dans ces conditions optimales, identiques pour les trois protéines étudiées, le volume nécessaire de glutaraldéhyde à une concentration de 2.5% et ce, pour un rapport optimal (40 mg glutaraldéhyde/g protéine) avec la protéine, est ajouté à la solution goutte-à-goutte sous agitation à vitesse moyenne. Une fois le traitement terminé après 30 minutes de chauffage, la température est rapidement diminuée à la température de la pièce à l'aide d'un bain de glace pour environ 30 minutes. Les autres composants décrits plus haut peuvent par la suite être ajoutés à la solution.

Le traitement enzymatique

Le traitement enzymatique des protéines est effectué avec la transglutaminase (TG-TI, Ajinomoto, Japon). La composition du TG-TI est de 99.0% de maltodextrine et 1.0% de transglutaminase. L'activité de la transglutaminase dans le TG-TI, déterminée par la compagnie Ajinomoto, est approximativement de 100U/g de poudre de TG-TI. Une fois le traitement à la chaleur des protéines terminé, la température est diminuée de 90°C à 50°C pour optimiser la réaction catalytique de l'enzyme (Motoki, 1994). Le pH optimal est de 7.0 et le temps de réaction d'environ 2 heures (Motoki, 1994). Dans ces conditions optimales pour les différentes protéines étudiées, la transglutaminase à un rapport enzyme/protéine de 4U de transglutaminase/g substrat est ajoutée à la solution. L'enzyme est inactivé après 120 minutes en plaçant la solution dans un bain-marie à 85°C pendant 20 minutes (Motoki, 1994).

6.2. Analyse structurale des protéines traitées par les 3 méthodes de réticulation

Pour ces analyses, les échantillons étudiés correspondaient à la fraction soluble de la solution d'enrobage contenant seulement la protéine à une concentration de 5% (sans traitement, traitée à la chaleur, traitée avec agent chimique et traitée avec l'enzyme). La fraction soluble de la solution représente les protéines dissoutes dans l'eau.

6.2.1. La chromatographie d'exclusion

Afin de déceler une modification de la masse moléculaire des protéines traitées avec les différentes méthodes de réticulation et d'estimer cette augmentation, une chromatographie d'exclusion a été effectuée avec des fractions protéiques solubles. Un appareil de type HPLC (chromatographie liquide à haute performance) Prostar 330 (Varian, USA) couplé à un auto-échantillonneur (modèle 9090, Varian, USA) a été utilisé (Vachon, 2000 ; Le Tien, 2000). La détection des fractions protéiques a été possible par l'utilisation du détecteur Prostar 230 (Varian, USA) à 280 nm. Deux colonnes de garde Supelco Progel TSK PWH (7.5 mm x 7.5 cm) et TSK GMPW (7.5 mm x 30 cm) (Supelco, Sigma, USA), suivie de deux colonnes analytiques Waters Ultra Hydrogel 2000 et 500 (7.5 mm x 30 cm) (Waters, Canada) ont été utilisées pour déterminer la masse moléculaire des protéines traitées et non traitées (contrôle). La masse moléculaire limite de ces colonnes a été déterminée à 25 000 000 Da avec le polyéthylène glycol linéaire. La phase mobile composée de 80% v/v aqueux et de 20% v/v acétonitrile a été introduite dans les colonnes à un taux d'élution stable de 0.8 mL/minute. Pour ce qui est de la partie aqueuse de la phase mobile, elle est composée de tampon Tris à 0.02M (pH 8) et de chlorure de sodium à 0.1M. Une courbe de calibration a été effectuée afin de permettre d'estimer la masse moléculaire des fractions protéiques. La série de protéines de masses moléculaires connues (Sigma, MW-GF-1000, St. Louis, MO, USA) de 29 000 Da à 2 000 000 Da a été utilisée. Il est important de noter que toutes les fractions protéiques à une concentration de 0.5% p/v ont été préalablement filtrées à travers une membrane de nylon à 0.45 µm avant d'être injectées dans le HPLC. La séparation des fractions protéiques s'est effectuée à la température ambiante. L'analyse des résultats a été exécutée avec le programme HPLC Prostar (Varian). Le temps d'analyse des protéines est de 60 minutes.

6.2.2. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide

La masse moléculaire caractéristique des protéines isolat de protéine de soja et caséinate de calcium (contrôle, chauffées, traitées avec l'agent chimique et traitées avec l'enzyme) a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) selon la méthode de Laemmli (1970). Cette méthode a été effectuée avec un Mini-PROTEAN II Cell (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Un gel d'entassement de 4% de polyacrylamide et un gel de séparation de 12% de polyacrylamide ont été utilisés pour réaliser cette séparation. Suite à la migration des échantillons à 120 V et 200 mA pendant 1 heure, les gels ont été colorés avec le Bleu de Coomassie brillant R-250 à 0.1% pendant 30 minutes dans un solvant comprenant 10/40/50 acide acétique/méthanol/eau et ont été décolorés dans le même solvant sans le colorant. Il est important de conserver le gel d'entassement car les protéines réticulées peuvent se retrouver dans ce dernier. Les protéines ayant une masse moléculaire trop grande ne peuvent pénétrer et migrer dans le gel de séparation. Les standards de poids moléculaire utilisés pour estimer le poids des bandes inconnues sont : myosine 200 kDa, β-galactosidase 116.25 kDa, phosphorylase b 97.4 kDa, albumine de sérum de bovin 66 kDa, ovalbumine 45 kDa et anhydrase carbonique 31 kDa, inhibiteur de trypsine de soja 21.5 kDa, Lypozyme 14.4 kDa et Aprotinine 6.5 kDa.

6.3. Mise au point d'un modèle pour évaluer la diffusion d'huile pour les différents enrobages

Le montage utilisé pour vérifier la diffusion d'huile pour les solutions d'enrobage a été conçu à partir de la méthode décrite par Fennema (1993). Dans un premier temps, des cacahuètes non salées (Kernels) sont pesées avant et après avoir été enrobées. L'enrobage des cacahuètes se fait comme suit : les cacahuètes fixées sur une aiguille sont trempées 3 fois dans une solution d'enrobage et sont à chaque fois séchées à l'aide d'un séchoir à main (Braun) à la force maximale pendant une durée minimale de 1 heure. Lorsque le dernier trempage est terminé, l'aiguille est retirée de la cacahuète et le trou formé est comblé avec une goutte de solution. Par la suite, les cacahuètes sont laissées à l'air libre au moins 24 heures à la température de la pièce pour permettre un séchage uniforme de la solution. Une fois les cacahuètes complètement sèches, elles sont pesées par groupe de 5 (équivalent à une masse d'environ 1g) et insérées dans une bouteille ambrée d'un volume d'environ 5 mL (Wheaton). Dans cette bouteille, une quantité équivalente à 3g d'huile de tricapryline (huile complètement saturée, Sigma, St. Louis, MO, USA) est ajoutée, soit une quantité suffisante pour recouvrir complètement les cacahuètes. Les bouteilles sont purgées à l'azote, fermées hermétiquement avec un bouchon et entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines.

La présence d'acide linoléique dans l'huile tricapryline est évaluée par la méthode AOAC (1984). Cette méthode est utilisée pour détecter la présence d'acides gras insaturés interrompus avec cis, cis-méthylène (non conjugués). L'enzyme utilisé dans cette méthode est la lipoxygénase qui catalyse l'oxydation des acides gras insaturés pour former un produit ayant une insaturation conjuguée. Ce produit ayant des doubles liaisons conjuguées est détecté à l'aide d'un spectrophotomètre (DMS 200, Varian) à une longueur d'onde de 234 nm. Une quantité de 2.5g de tricapryline est prélevée de la bouteille (Wheaton). L'huile est ensuite diluée par un facteur de 100 dans l'hexane (Laboratoire Mat, Québec, Canada). Par la suite, 1 mL est prélevé et est évaporé à sec avec un jet d'azote. Les acides gras sont saponifiés avec de l'hydroxyde de potassium 1.0M(Laboratoire Mat, Québec, Canada) pendant un minimum de 5 heures dans le noir à

la température de la pièce. Les acides gras sont ensuite dilués par un facteur de 100 dans un tampon borate 1.0M et de l'eau. Un volume de 3 mL de cette solution est prélevé dans 4 tubes. Dans les 2 premiers tubes, ajouter 0.100 mL de la solution active de la lipoxygénase à 50 023U/mL. Dans les 2 tubes restants qui vont représenter les blancs, ajouter l'enzyme inactivé à 90°C pendant 5 minutes. Finalement, les échantillons sont incubés à la température de la pièce pendant 30 minutes sous agitation et mesurés. Une courbe de calibration entre 2 et 12 µg d'acide linoléique/mL d'échantillon est établie en utilisant des quantités connues de trilinoléine (équivalent de l'acide linoléique, Sigma, St. Louis, MO, USA). Une équation de type y = mx + b est déterminée avec la courbe de calibration. À partir de cette équation, la valeur en absorbance obtenue pour un échantillon correspond à une concentration d'acide linoléique. Cette valeur est multipliée par un facteur de 10 000 et divisée par la quantité de cacahuète pesée avant l'application de l'enrobage. La diffusion d'huile de cacahuète est déterminée selon ces analyses et les résultats sont exprimés en µg ou mg d'acide linoléique/g de cacahuète selon le temps voulu à une température de 30°C. À cette température, il y a présence d'une plus grande quantité de lipides fluides dans les arachides, permettant ainsi une diffusion dite accélérée.

Formule : concentration d'acide linoléique (µg) x 10 000 (facteur de dilution) / g de cacahuète

6.4. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS (version 10.1). Les moyennes de taux de diffusion pour chaque solution d'enrobage ont été comparées à l'aide du test d'analyse de variance à un facteur contrôlé par one-way Anova, suivi d'un test de comparaisons multiples de Duncan avec un niveau de signification de p≤ 0.05. L'étude des deux concentrations de glycérol a été réalisée en triplicata et pour chaque répétition, deux échantillons ont été analysés. L'étude des trois concentrations de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne a été réalisée en triplicata et pour chaque répétition, deux échantillons ont été analysés. L'étude des trois méthodes de réticulation

(chauffage, glutaraldéhyde et transglutaminase) a été réalisée en triplicata et pour chaque répétition, deux échantillons ont été analysés. Pour chaque jour d'analyse (21, 42, 63 et 84), les traitements ont été comparés entre eux par un test de Duncan avec un niveau de confiance de $p \le 0.05$. Un résultat est statistiquement significatif lorsque $p \le 0.05$.

7. Résultats

7.1. Étude de la diffusion d'huile pour différentes formulations à base de protéines

7.1.1. Étude de la diffusion d'huile d'arachide pour différentes concentrations de glycérol ajoutées aux solutions d'isolat de protéine de soja, d'isolat de protéine du lactosérum et de caséinate de calcium

Le tableau III et la figure 5 montrent les taux de diffusion d'huile pour différents enrobages selon la concentration de glycérol et la durée d'entreposage. Les résultats montrent que la concentration en glycérol affecte la diffusion d'huile selon la protéine utilisée. Lorsqu'un enrobage à base d'isolat de protéine du lactosérum ou de caséinate de calcium est utilisé, une augmentation de la concentration de glycérol diminue significativement l'efficacité de la solution d'enrobage et ce, pendant les 12 semaines d'analyse. Pour une solution à base d'isolat de protéine de soja, une élévation de la concentration de l'agent plastifiant semble plutôt bénéfique. Une augmentation de 10% à 20% de glycérol dans les formulations à base d'isolats de protéine du lactosérum et de caséinate de calcium augmente respectivement le taux de diffusion de 13% et de 7%. Une augmentation de 89% à 103% est observée pour l'isolat de protéine du lactosérum et une augmentation de 83% à 89% est observée pour les enrobages à base de caséinate de calcium. Pour ce qui est de l'isolat de protéine de soja, les données révèlent qu'une concentration de 10% à 20% de glycérol dans la formulation augmente l'efficacité de 16%. Le taux de diffusion est respectivement de 77.08 mg/g et de 64.87 mg/g par rapport à une concentration de 20%. De par sa nature hydrophile, le glycérol devrait améliorer l'effet de barrière aux acides gras ou simplement ne pas affecter la diffusion. Mais, de par sa capacité à s'intercaler entre les chaînes protéiques, il pourrait couper des liaisons et ainsi diminuer l'étanchéité du film aux acides gras. L'efficacité de la solution d'enrobage semble augmenter avec une élévation de la concentration dans le cas de l'isolat de protéine de soja. Il est possible pour l'isolat de protéine du lactosérum et le caséinate de calcium que la présence d'un polyol affecte le réseau d'interactions entre les protéines et ainsi il peut fournir l'espace nécessaire au passage des acides gras. Pour les expériences suivantes, une concentration de 10% de glycérol a été utilisée. Cette concentration permet d'obtenir une solution qui se manipule plus aisément. De plus, une concentration trop élevée de glycérol amène une baisse de l'efficacité pour la plupart des protéines et un coût assez élevé de la solution d'enrobage.

Après 12 semaines, l'enrobage avec le caséinate de calcium, l'isolat de protéine de soja et l'isolat de protéine du lactosérum en présence de 10% de glycérol réduit de 99 mg/g à 83 mg/g, 77 mg/g et 89 mg/g le taux de diffusion d'huile. À une concentration de 20% de glycérol, le taux de diffusion passe de 99 mg/g à 89 mg/g, 64 mg/g et 103 mg/g de diffusion d'huile respectivement pour le caséinate de calcium, l'isolat de protéine de soja et l'isolat de protéine du lactosérum. Ces résultats montrent que l'isolat de protéine de soja est la protéine la plus efficace et qu'une augmentation de glycérol réduit davantage le taux de diffusion alors que pour les autres protéines une augmentation de la concentration de glycérol diminue l'efficacité de l'enrobage. Une efficacité de 16% est observée pour l'isolat de protéine de soja comparativement à 13% et 7% pour le caséinate de calcium et l'isolat de protéine du lactosérum.

<u>Tableau III</u>. Mesure de la diffusion d'huile d'arachide en mg acide linoléique/g de cacahuète pour les enrobages à base d'isolat de protéine de soja, de caséinate de calcium et d'isolat de protéine du lactosérum ayant différentes concentrations de glycérol et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines.

Enrobage		Taux de diffusion (mg d'acide linoléique/g de cacahuète) Durée d'entreposage (semaines)					
Protéine	Glycérol (%)	3	6	9	12		
IPL 5%	10	43.97 ^a ±2.03	53.58 a ±0.68	78.76 ^a ±2.61	89.84 ^a ±4.55		
IPL 5%	20	54.87 b ±2.99	65.09 b ±1.18	81.08 a ±2.31	103.5 b ±2.80		
IPS 5%	10	28.06 ° ±1.42	52.69 a ±3.26	65.63 b ±4.46	77.08 ° ±3.40		
IPS 5%	20	32.32 d ±1.07	42.54 ° ±0.84	50.64 ° ±1.22	64.87 d ±0.82		
Caséinate 5%	10	44.62 a ±1.69	49.92 ^d ±0.44	74.35 a ±2.40	83.31 e ±1.34		
Caséinate 5%	20	44.51 a ±2.03	44.55 e ±0.94	54.08 ° ±3.36	89.11 a ±1.76		
Aucun	-	53.38 b ±0.20	62.05 f ±1.61	68.23 b ±3.70	99.22 b ±3.09		

a, b, c, d, e, f Pour chaque jour d'analyse et chaque solution d'enrobage, une moyenne suivie d'une lettre différente indique une différence significative (p≤0.05) entre les taux de diffusion.

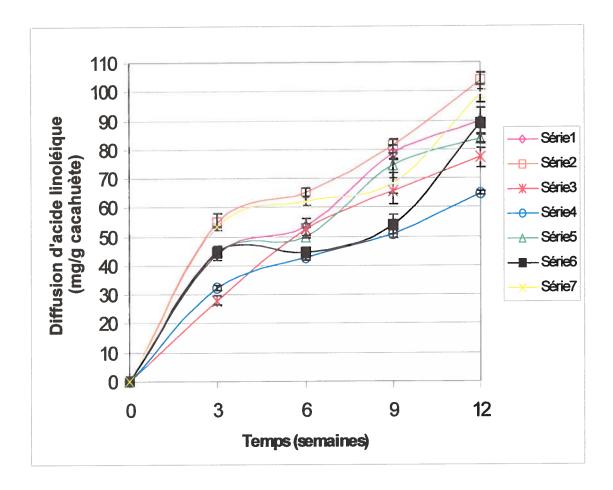


Figure 5. Courbe de la diffusion d'huile pour des cacahuètes enrobées avec des formulations à base d'isolat de protéine de soja, de caséinate de calcium et d'isolat de protéine du lactosérum avec différentes concentrations de glycérol qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines. Série 1 : IPL 5% + glycérol 10%. Série 2 : IPL 5% + glycérol 20%. Série 3 : IPS 5% + glycérol 10%. Série 4 : IPS 5% + glycérol 20%. Série 5 : caséinate de calcium 5% + glycérol 20%. Série 7 : témoin sans enrobage.

7.1.2. Effet du traitement de la chaleur des solutions d'enrobage à base de protéines sur le taux de diffusion de l'huile d'arachide

La chaleur peut favoriser la formation de ponts intermoléculaires et ce traitement a été utilisé pour vérifier son efficacité à réduire la diffusion de l'huile.

Le tableau IV et la figure 6 démontrent en général une augmentation de l'efficacité des solutions d'enrobage traitées par thermocondensation après 12 semaines d'entreposage à 30°C. Cette amélioration est significative seulement pour l'isolat de protéine de soja et le caséinate de calcium. Elle est respectivement de 7% (77.08 mg/g → 71.94 mg/g) et de 4% (83.31 mg/g \rightarrow 80.51 mg/g) par rapport aux solutions d'enrobage non traitées et respectivement de 28% et de 19% par rapport au témoin sans enrobage. Pour ce qui est des isolats de protéine du lactosérum, le traitement à la chaleur ne semble pas améliorer significativement l'efficacité de la solution. Cette dernière protéine a été principalement étudiée pour sa grande capacité à réticuler par thermocondensation. À la lumière de ces résultats, l'utilisation de cette dernière protéine ne semble pas intéressante. En général, la formation d'un réseau d'interactions intermoléculaires covalentes entre les protéines ne semble apporter qu'un faible support à la solution d'enrobage. L'ajout d'un enrobage a réduit la diffusion d'huile de 99 mg/g à 83 mg/g, 77 mg/g et 89 mg/g respectivement en présence de caséinate de calcium, d'IPS et d'IPL. Le taux d'efficacité est respectivement de 15%, 22% et 10% pour les enrobages à base de ces protéines. En chauffant les protéines, le taux de diffusion passe de 83 mg/g à 80 mg/g pour le caséinate de calcium; de 77 mg/g à 71 mg/g pour l'isolat de protéine de soja et de 89 mg/g à 83 mg/g pour l'isolat de protéine du lactosérum. Le traitement à la chaleur de ces protéines réduit le taux de diffusion d'huile de 7, 7 et 4% respectivement.

<u>Tableau IV</u>. Mesure de la diffusion d'huile d'arachide en mg acide linoléique / g de cacahuète pour les solutions d'enrobage à base de d'isolat de protéine de soja, de caséinate de calcium et d'isolat de protéine du lactosérum ayant été traitées à la chaleur et contenant 10% de glycérol et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines.

Enrobage		Taux de diffusion (mg d'acide linoléique/g d'arachide					
		Durée d'entreposage (semaines)					
Protéine	Traitement	3	6	9	12		
IPL 5%	_	43.97 a	53.58 ^a	78.76 ^a	89.84 ^a		
		±2.03	±0.68	±2.61	±4.55		
IPL 5%	80°C	49.91 b	50.63 a	76.86 ª	83.95 a		
11 11 370	30 minutes	±0.13	±2.16	±2.76	±2.24		
IPS 5%		28.06 °	52.69 a	65.63 b	77.08 b		
II 3 370	-	±1.42	±3.26	±4.46	±3.40		
IPS 5%	90°C	39.86 ^d	45.78 b	75.23 ^a	71.94 °		
11 5 5 7 0	30 minutes	±0.41	±0.85	±1.03	±1.26		
Caséinate 5%	-	44.62 a	49.92 a	74.35 a	83.31 a		
Casemate 370		±1.69	±0.44	±2.40	±1.34		
Caséinate 5%	90°C	43.28 b	48.31 ab	66.78 b	80.51 b		
	30 minutes	±0.79	±3.36	±2.38	±1.17		
Aucun	-	53.38 ^e	62.05 °	68.23 b	99.22 d		
Aucuii		±0.20	±1.61	±3.70	±3.09		

a, b, c, d, e Pour chaque jour d'analyse et chaque solution, une moyenne suivie d'une lettre différente indique une différence significative (p≤0.05) entre les taux de diffusion.

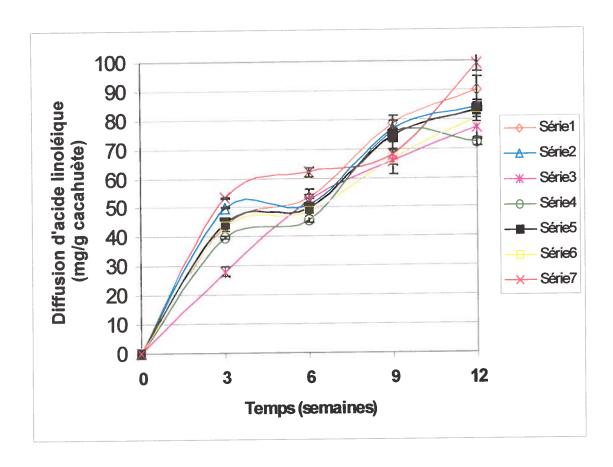


Figure 6. Courbe de la diffusion d'huile pour des cacahuètes enrobées avec les formulations à base d'isolat de protéine de soja, de caséinate de calcium et d'isolat de protéine du lactosérum ayant été traitées à la chaleur, et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines. Série 1 : IPL 5% + glycérol 10%. Série 2 : IPL 5% traitée à 80°C pendant 30 minutes + glycérol 10%. Série 3 : IPS 5% + glycérol 10%. Série 4 : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10%. Série 5 : caséinate de calcium 5% + glycérol 10%. Série 6 : caséinate de calcium 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10%. Série 7 : témoin sans enrobage.

7.1.3. Effet de l'ajout d'un polysaccharide (carboxyméthylcellulose) sur le taux de diffusion de l'huile

Les résultats du tableau V et de la figure 7 montrent que l'addition de carboxyméthylcellulose est bénéfique pour les solutions à base d'isolat de protéine de soja et à base de caséinate de calcium. La présence de carboxyméthylcellulose dans les solutions d'enrobage occasionne une diminution significative de la diffusion d'huile. Après 12 semaines, les résultats montrent que l'ajout d'un enrobage réduit significativement de 99 mg/g à 80 mg/g et 71 mg/g le taux de diffusion d'huile en présence de caséinate de calcium et d'isolats de protéine de soja respectivement. Cette réduction significative représente une efficacité respective de 40% et de 47%. L'ajout de carboxyméthylcellulose dans les enrobages à base d'isolats de protéine de soja et de caséinate de calcium réduit significativement de 71 mg/g à 52 mg/g et de 80 mg/g à 59 mg/g le taux de diffusion respectivement. Ces valeurs représentent une efficacité respective de 28% et de 27%. L'ajout du carboxyméthylcellulose démontre bien que l'addition de ce polysaccharide cationique dans la solution d'enrobage est favorable pour réduire la diffusion d'huile.

<u>Tableau V</u>. Mesure de la diffusion d'huile d'arachide en mg acide linoléique / g de cacahuète pour les solutions d'enrobage à base d'isolat de protéine de soja et de caséinate de calcium traitées à la chaleur avec une concentration de 10% de glycérol et en présence de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne, et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines

Enrobage			Taux de diffusion (mg d'acide linoléique/g de cacahuète) Durée d'entreposage (semaines)				
Protéine	Traitement	CMC	3	6	9	12	
IPS 5%	90°C 30 minutes	-	39.86 a ±0.41	45.78 a ±0.85	75.23 a ±1.03	71.94 ^a ±1.26	
IPS 5%	90°C 30 minutes	0.5 %	9.55 b ±1.06	29.50 b ±1.14	40.15 b ±0.88	52.18 b ±1.51	
Caséinate 5%	90°C 30 minutes	-	43.28 ° ±0.79	48.31 a ±3.36	66.78 ° ±2.38	80.51 ° ±1.17	
Caséinate 5%	90°C 30 minutes	0.5 %	18.84 ^d ±0.78	33.09 ° ±0.92	55.11 ^d ±2.29	59.16 d ±1.26	
Aucun	-	-	53.38 ° ±0.20	62.05 ^d ±1.61	68.23 ° ±3.70	99.22 ° ±3.09	

a, b, c, d, e Pour chaque jour d'analyse et chaque solution, une moyenne suivie d'une lettre différente indique une différence significative (p≤0.05) entre les taux de diffusion.

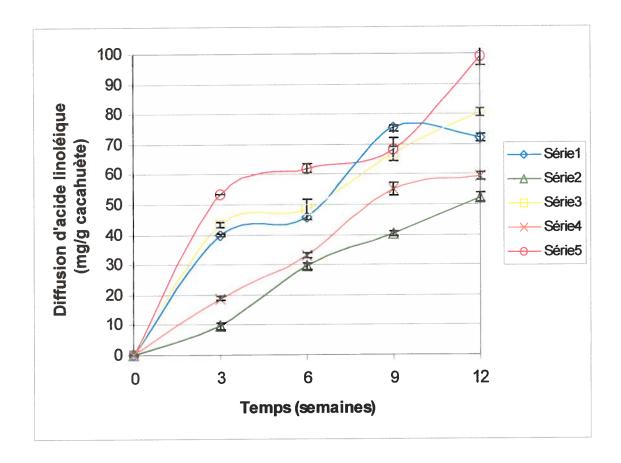


Figure 7. Courbe de la diffusion d'huile pour des cacahuètes enrobées avec les formulations à base d'isolats de protéine de soja et de caséinate de calcium, ayant été traitées à la chaleur en présence de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne, et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines. Série 1 : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10%. Série 2 : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10%. Série 3 : caséinate de calcium 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10%. Série 4 : caséinate de calcium 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 %. Série 5 : témoin sans enrobage.

7.1.4. Effet de l'ajout de pectine sur le taux de diffusion de l'huile

L'ajout de la pectine dans la solution d'enrobage à base d'isolats de protéine de soja ou de caséinate de calcium contenant du carboxyméthylcellulose augmente significativement la diffusion d'huile après 12 semaines d'entreposage à 30°C. Selon, les résultats du tableau VI et de la figure 8, l'ajout de protéines chauffées réduit de 99 mg/g à 59 mg/g et 52 mg/g respectivement pour le caséinate de calcium et les isolats de protéine de soja ce qui représente une efficacité respective de 40% et 48%. Cependant, l'ajout de pectine augmente de 52 mg/g à 70 mg/g et de 59 mg/g à 69 mg/g le taux de diffusion représentant une diminution de 26% et de 15% du taux de diffusion d'huile. La présence de pectine (Hercules, DD slow set) a peut être contribué à dissimuler les groupements chargés des autres composants des solutions d'enrobage. Son utilisation pour cette application ne semble pas favorable.

<u>Tableau VI</u>. Mesure de la diffusion d'huile d'arachide en mg acide linoléique / g de cacahuète pour les solutions d'enrobage à base d'isolat de protéine de soja et de caséinate de calcium traités à la chaleur avec 10% de glycérol et 0.5% de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne et de pectine, et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines

Enrobage			Taux de diffusion (mg d'acide linoléique/g de cacahuète) Durée d'entreposage (semaines)				
Protéine	Traitement	Pectine	3	6	9	12	
IPS 5%	90°C 30 minutes	-	9.55 a ±1.06	29.50 a ±1.14	40.15 a ±0.88	52.18 a ±1.51	
IPS 5%	90°C 30 minutes	0.25%	23.69 b ±1.23	38.77 b ±2.78	70.64 b ±3.01	70.20 b ±1.67	
Caséinate 5%	90°C 30 minutes	-	18.84 ° ±0.78	33.09 ° ±0.92	55.11 ° ±2.29	59.16° ±1.26	
Caséinate 5%	90°C 30 minutes	0.25%	24.16 b ±0.48	37.24 b ±1.49	61.60 ^d ±0.32	69.40 b ±2.35	
Aucun	-	-	53.38 d ±0.20	62.05 ^d ±1.61	68.23 b ±3.70	99.22 ^d ±3.09	

a, b, c, d Pour chaque jour d'analyse et chaque solution, une moyenne suivie d'une lettre différente indique une différence significative (p≤0.05) entre les taux de diffusion.

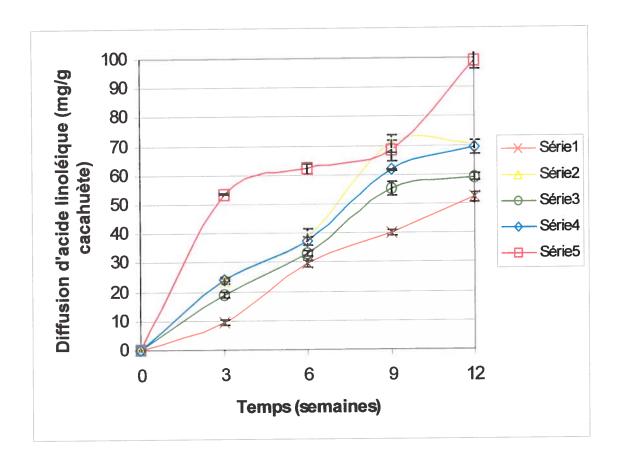


Figure 8. Courbe de la diffusion d'huile pour des cacahuètes enrobées avec les formulations à base d'isolat de protéine de soja et de caséinate de calcium, ayant été traitées à la chaleur en présence de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne et de pectine, et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines. Série 1 : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5%. Série 2 : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5% + pectine 0.25%. Série 3 : caséinate de calcium 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 %. Série 4 : caséinate de calcium 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 % + pectine 0.25%. Série 5 : témoin sans enrobage.

7.1.5. Effet de l'ajout de l'amidon sur le taux de diffusion de l'huile

L'addition d'amidon dans la solution à base d'isolat de protéine de soja contenant du carboxyméthylcellulose a provoqué une baisse significative de 11%, après 12 semaines, la diffusion des acides gras par rapport à la solution sans amidon. Pour la solution à base de caséinate de calcium, la présence d'amidon n'a pas affecté significativement la migration d'huile par rapport à la solution exempte d'amidon. Les valeurs de diffusion d'huile observées dans le tableau VII pour les solutions à base d'isolat de protéine de soja et de caséinate de calcium, après douze semaines d'entreposage, sont respectivement de 46.52 mg/g et 60.06 mg/g. Il est important de souligner que ces solutions d'enrobage réduisent respectivement la diffusion de 53% et 40% par rapport au témoin sans enrobage. Ce polysaccharide n'affecte pas le réseau formé par les protéines et le carboxyméthylcellulose. De plus, il semble améliorer le réseau dans le cas des isolats de protéine de soja. Cette amélioration significative est peut être due à une plus grande quantité d'interactions non électrostatiques possibles entre l'isolat de protéine de soja et l'amidon par rapport au caséinate de calcium.

<u>Tableau VII</u>. Mesure de la diffusion d'huile en mg acide linoléique / g de cacahuète pour les solutions d'enrobage à base d'isolat de protéine de soja et de caséinate de calcium traitées à la chaleur, avec 10% de glycérol, 0.5% de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne et d'amidon, et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines.

Enrobage			Taux de diffusion (mg d'acide linoléique/g de cacahuète)				
			<u>Du</u>	ree d'entre	oosage (sema	ines)	
Protéine	Traitement	Amidon	3	6	9	12	
IPS 5%	90°C 30 minutes	_	9.55 a ±1.06	29.50° ±1.14	40.15 a ±0.88	52.18 a ±1.51	
IPS 5%	90°C 30 minutes	0.25%	8.22 a ±0.41	23.61 b ±1.31	42.10 a ±0.42	46.52 b ±1.03	
Caséinate 5%	90°C 30 minutes	-	18.84 b ±0.78	33.09 ° ±0.92	55.11 b ±2.29	59.16 ° ±1.26	
Caséinate 5%	90°C 30 minutes	0.25%	18.57 b ±0.92	32.33 ° ±0.53	47.81 ° ±2.16	60.06 ° ±1.66	
Aucun	-	-	53.38 ° ±0.20	62.05 ^d ±1.61	68.23 ^d ±3.70	99.22 ^d ±3.09	

a, b, c, d Pour chaque jour d'analyse et chaque solution, une moyenne suivie d'une lettre différente indique une différence significative (p≤0.05) entre les taux de diffusion.

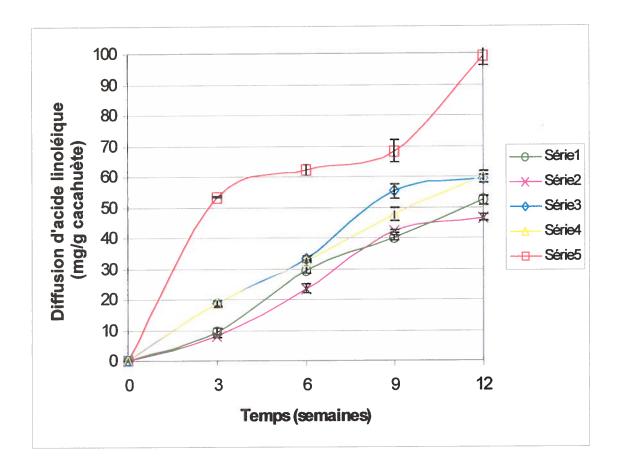


Figure 9. Courbe de la diffusion d'huile pour des cacahuètes enrobées avec les formulations à base d'isolat de protéines de soja, de caséinate de calcium et d'isolats de protéine du lactosérum, ayant été traitées à la chaleur en présence de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne et d'amidon, et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines. Série 1 : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5%. Série 2 : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5% + amidon 0.25%. Série 3 : caséinate de calcium 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 % traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 % traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 % traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 % traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 % traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 % + amidon 0.25%. Série 5 : témoin sans enrobage.

7.1.6. Effet de différentes formes de réticulation d'isolats de protéine de soja et caséinate de calcium sur le taux de diffusion de l'huile

Dans une expérience précédente, il a été démontré que la formation de ponts intermoléculaires par la chaleur est bénéfique face à la diffusion de l'huile d'arachide. La réticulation des protéines peut se faire selon trois méthodes : physique, chimique et enzymatique. En plus de former des ponts de type disulfure entre les protéines par la chaleur, il est possible de catalyser la formation de liaisons covalentes entre les protéines par l'ajout d'un agent chimique comme le glutaraldéhyde, qui agit comme intermédiaire entre les protéines, ou par l'ajout d'un enzyme comme la transglutaminase.

Le tableau VIII et la figure 10 démontrent une augmentation de l'efficacité des solutions d'enrobage traitées par thermocondensation après 12 semaines d'entreposage à 30°C. Selon les résultats du tableau VI et de la figure 6, cette amélioration reste significative pour l'isolat de protéine de soja mais non pour le caséinate de calcium. Cette amélioration est de 42% (42.16 mg/g → 24.43 mg/g) pour l'isolat de protéine de soja par rapport aux solutions d'enrobage non traitées et de 67% par rapport au témoin sans enrobage. Dans cette expérience, le traitement à la chaleur du caséinate de calcium ne semble pas favoriser l'efficacité de l'enrobage face à la diffusion d'huile contrairement à une expérience précédente. La diffusion d'huile est de 36.06 mg/g pour l'enrobage traité et de 35.19 mg/g pour l'enrobage n'ayant pas été traité. L'écart entre l'enrobage à base caséinate de calcium traité ou non avec le témoin sans enrobage est toujours intéressant. Cette diminution significative est respectivement de 51% et de 52% par rapport au témoin.

Une réticulation plus prononcée de l'isolat de protéine de soja et du caséinate de calcium par le traitement avec le glutaraldéhyde et la transglutaminase ne semble pas être bénéfique pour les enrobages face à la diffusion d'huile. Pour l'isolat de protéine de soja et le caséinate de calcium, le traitement avec la glutaraldéhyde augmente significativement la diffusion d'huile par rapport à la protéine traitée seulement à la chaleur. Cette augmentation est respectivement de 52% et de 60%. Pour le traitement

avec la transglutaminase, cette perte d'efficacité n'est pas significative pour l'isolat de protéine de soja et moins prononcée pour le caséinate de calcium par rapport au traitement avec le glutaraldéhyde. Le taux de diffusion pour l'enrobage à base d'isolat de protéine de soja traitée avec la transglutaminase est de 24.44 mg/g. Pour le caséinate de calcium, le taux est de 43.15 mg/g ce qui représente une augmentation de 16% par rapport à l'enrobage traité seulement par thermocondensation. Le traitement de ces protéines par la glutaraldéhyde et la transglutaminase ne semble pas influencer ou améliorer l'efficacité des enrobages. La thermocondensation semble donner un niveau de réticulation suffisante pour obtenir une efficacité optimale.

Dans cette expérience, les enrobages à base d'isolat de protéine de soja et de caséinate de calcium ont été comparés à l'enrobage utilisé commercialement (sucres 40% + gomme arabique 10%). Tous les enrobages à base de protéines testés dans cette expérience sont plus efficaces que la solution commerciale après 12 semaines d'entreposage à 30°C. L'enrobage à base d'isolat de protéine de soja traité à la chaleur donne un écart de 63% par rapport à l'enrobage commercial et l'enrobage à base de caséinate de calcium non traité possède un écart de 47% par rapport à ce même enrobage.

Tableau VIII . Mesure de la diffusion d'huile en mg d'acide linoléique / g de cacahuète pour les solutions d'enrobage à base d'isolat de protéine de soja et de caséinate de calcium traitées par trois méthodes de réticulation (thermocondensation, glutaraldéhyde et transglutaminase), avec 10% de glycérol, 0.5% de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne, et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines.

Enrobage Taux de diffusion (mg d'acide linoléique/g de cacahuète)

		Durée d'entreposage (semaines)				
Protéine	Traitement	3 6		9	12	
IPS 5%	-	16.09 ^{cd}	23.49 °	29.98°	42.16 °	
11 3 370		± 1.73	± 1.28	± 3.28	± 2.30	
IDO 50/	90°C	8.92 ^a	16.38 b	21.76 b	24.43 a	
IPS 5%	30 minutes	± 3.80	± 0.67	± 1.49	± 0.97	
IPS 5%	90°C	12.98 bc	21.64 °	32.86 ^c	46.65 °	
IFS 370	30 minutes + Glutaraldéhyde	± 0.65	± 4.33	± 2.08	± 3.51	
IPS 5%	90°C	10.27 ab	13.17 a	17.83 ^a	24.44 ^a	
IPS 370	30 minutes + Transglutaminase	± 2.03	± 1.98	± 3.28	± 1.65	
Caséinate 5%	_	13.62 bc	17.22 b	37.88 d	35.19 ^b	
Casemate 3%	-	± 0.95	± 0.76	± 1.28	± 1.13	
G	90°C	12.82 bc	21.78 °	31.56 °	36.06 b	
Caséinate 5%	30 minutes	± 1.87	± 1.08	± 2.68	± 2.76	
Caséinate 5%	90°C	18.83 ^d	35.19 e	44.12 e	59.88 ^d	
Casemate 370	30 minutes + Glutaraldéhyde	± 2.34	± 1.45	± 1.61	± 3.11	
Caséinate 5%	90°C	15.16 °	24.04 °	31.41 °	43.15 °	
Casemate 370	30 minutes + Transglutaminase	± 0.55	± 1.04	± 0.75	± 1.61	
Sucres +	_	26.97 e	29.57 ^d	41.75 e	66.53 ^e	
gomme arabique	-	± 1.54	± 4.38	± 0.99	± 4.03	
Aucun	_	30.38 ^f	31.09 d	56.18 ^f	73.03 ^f	
Aucun		± 4.38	± 4.11	± 0.09	± 7.41	

a, b, c, d, e, f Pour chaque jour d'analyse et chaque solution, une moyenne suivie d'une lettre différente indique une différence significative (p≤0.05) entre les taux de diffusion.

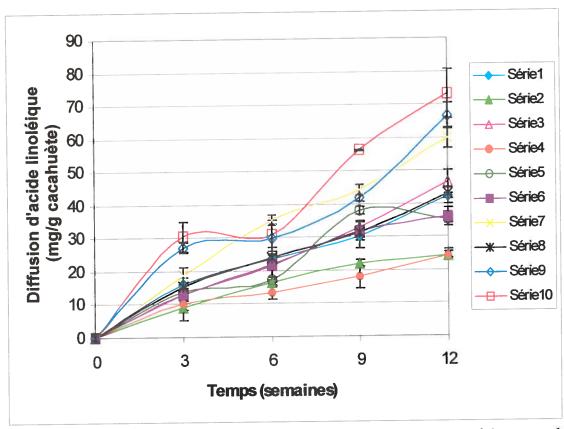


Figure 10. Courbe de la diffusion d'huile pour des cacahuètes enrobées avec les formulations à base d'isolats de protéine de soja, de caséinate de calcium et d'isolat de protéine du lactosérum, ayant été traitées par trois méthodes de réticulation (chaleur, glutaraldéhyde et transglutaminase) en présence de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne, et qui ont été entreposées à 30°C pendant 3, 6, 9 et 12 semaines. Série 1 : IPS 5% + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5%. Série 2 : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5%. Série 3 : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes et glutaraldéhyde 40mg/g protéine à 50°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5%. Série 4 : : IPS 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes et transglutaminase 4U/g protéine à 50°C pendant 120 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5%. Série 5 : caséinate de calcium 5% + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 %. Série 6 : caséinate de calcium 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 %. Série 7: Caséinate de calcium 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes et Glutaraldéhyde 40mg/g protéine à 50°C pendant 30 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 %. Série 8 : caséinate de calcium 5% traitée à 90°C pendant 30 minutes et transglutaminase 4U/g protéine à 50°C pendant 120 minutes + glycérol 10% + carboxyméthylcellulose 0.5 %. Série 9 : témoin sans enrobage.

7.2. Étude de la réticulation de l'isolat de protéine de soja et du caséinate de calcium

- 7.2.1. Étude de la réticulation de l'isolat de protéine de soja et du caséinate de calcium par électrophorèse sur gel de polyacrylamide
- 7.2.1.1. Étude de l'isolat de protéine de soja réticulée par les trois méthodes : chaleur glutaraldéhyde et transglutaminase.

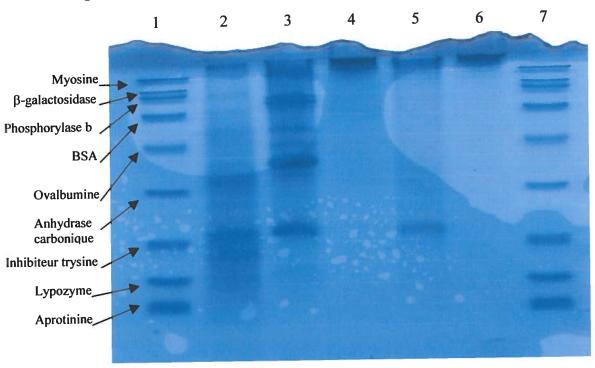
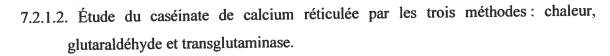


Figure 11. Gel de polyacrylamide SDS-PAGE de l'isolat de protéines de soja traitée par trois méthodes de réticulation : chaleur, glutaraldéhyde et transglutaminase. Puits 1 et 7: standards de poids moléculaire. Puits 2 : IPS traitée à 90°C pendant 30 minutes. Puits 3 : IPS non traitée. Puits 4 : IPS traitée avec le glutaraldéhyde 40mg/g protéine à 50°C pendant 30 minutes (pH 7). Puits 5 : IPS traitée avec la transglutaminase 4U/g protéine à 50°C pendant 120 minutes (pH 7). Puits 6 : IPS traitée à la chaleur + glutaraldéhyde + transglutaminase dans les mêmes conditions décrites précédemment.



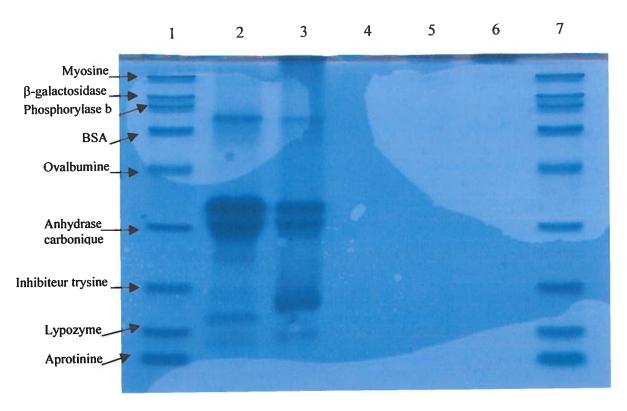
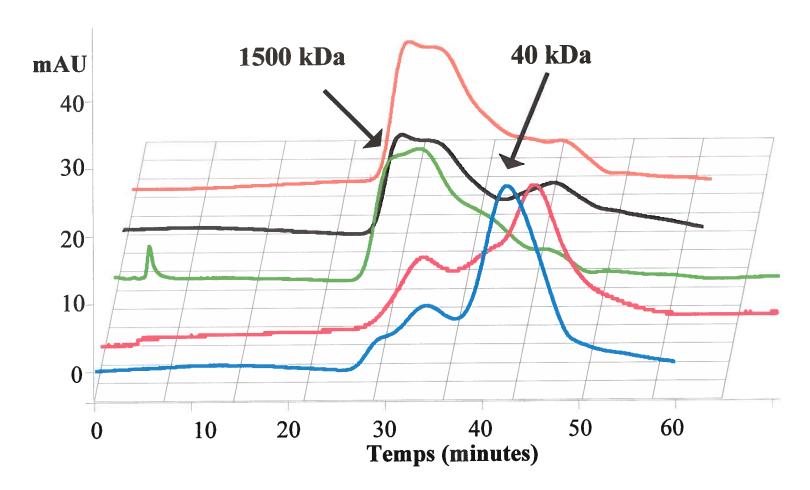


Figure 12. Gel de polyacrylamide SDS-PAGE de la protéine caséinate de calcium traitée par trois méthodes de réticulation : chaleur, glutaraldéhyde et transglutaminase. Puits 1 et 7: standards de poids moléculaire. Puits 2 : caséinate de calcium non traitée. Puits 3 : caséinate de calcium traitée à 90°C pendant 30 minutes. Puits 4 : caséinate de calcium traitée avec le glutaraldéhyde 40mg/g protéine à 50°C pendant 30 minutes (pH 7). Puits 5 : caséinate de calcium traitée avec la transglutaminase 4U/g protéine à 50°C pendant 120 minutes (pH 7). Puits 6 : caséinate de calcium traitée à la chaleur + glutaraldéhyde + transglutaminase dans les mêmes conditions décrites précédemment.

- 7.2.2. Étude de la réticulation de l'isolat de protéines de soja et du caséinate de calcium par chromatographie d'exclusion
- 7.2.2.1. Étude de l'isolat de protéines de soja réticulée par les trois méthodes : chaleur, glutaraldéhyde et transglutaminase



<u>Figure 13</u>. Chromatogramme de la chromatographie d'exclusion de la protéine isolat de protéines de soja traitée par trois méthodes de réticulation : chaleur, glutaraldéhyde et transglutaminase. Trait bleu : IPS non traitée. Trait rouge : IPS traitée à 90°C pendant 30 minutes. Trait vert : IPS traité avec le glutaraldéhyde 40mg/g protéine à 50°C pendant 30 minutes (pH 7). Trait noir : IPS traitée avec la transglutaminase 4U/g protéine à 50°C pendant 120 minutes (pH 7). Trait orange : IPS traitée à la chaleur + glutaraldéhyde + transglutaminase dans les mêmes conditions décrites précédemment.

7.2.2.2. Étude du caséinate de calcium réticulée par les trois méthodes : chaleur, glutaraldéhyde et transglutaminase

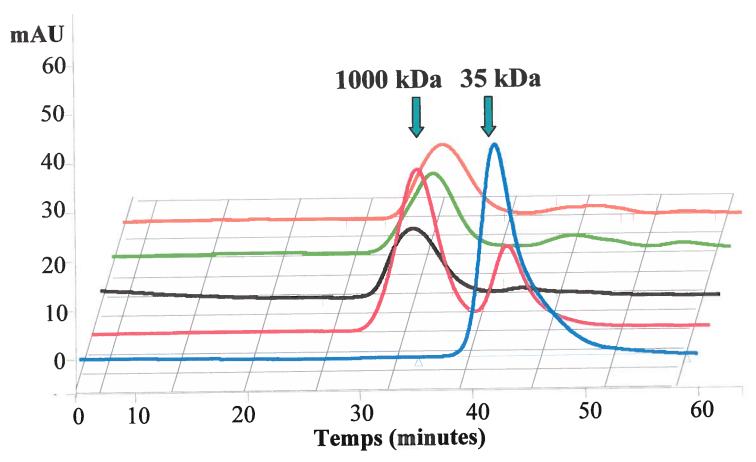


Figure 14. Chromatogramme de la chromatographie d'exclusion de la protéine caséinate de calcium traitée par trois méthodes de réticulation : chaleur, glutaraldéhyde et transglutaminase. Trait bleu : caséinate de calcium non traitée. Trait rouge : caséinate de calcium traitée à 90°C pendant 30 minutes. Trait vert : caséinate de calcium traitée avec le glutaraldéhyde 40mg/g protéine à 50°C pendant 30 minutes (pH 7). Trait noir : caséinate de calcium traitée avec la transglutaminase 4U/g protéine à 50°C pendant 120 minutes (pH 7). Trait orange : caséinate de calcium traitée à la chaleur + glutaraldéhyde + transglutaminase dans les mêmes conditions décrites précédemment.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la chromatographie d'exclusion permettent de déceler la présence de réticulation chez les protéines. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide sépare les protéines sous forme de bandes selon leur poids caractéristique. Plus le poids d'une protéine est élevé, plus la migration dans le gel est lente. Cette méthode caractérise la réticulation des protéines par une baisse d'intensité des bandes et l'apparition d'une bande dans le gel d'entassement qui correspond à une protéine avec un poids trop élevé pour migrer dans le gel. La chromatographie d'exclusion permet de séparer les protéines selon la grosseur et pas nécessairement le poids. Cette méthode utilise des billes ayant un petit diamètre qui retiennent les petites protéines plus facilement que les grosses protéines. Les petites protéines passent donc plus de temps dans la colonne que les grosses. Cette dernière caractérise la réticulation par un déplacement des pics vers des temps plus courts (gauche).

Selon les figures 11 à 14, il est évident que l'isolat de protéine de soja est très hétérogène par rapport à la protéine caséinate de calcium. La protéine IPS possède plus de bandes sur le gel de polyacrylamide et les pics sur le chromatogramme s'étendent sur plus de temps.

La figure 11 démontre pour l'isolat de protéine de soja non traitée possède quatre bandes intenses avec des poids moléculaire d'environ >200 kDa, 80 kDa, 40 kDa et 25 kDa. Suite à la thermocondensation, ces bandes caractéristiques baissent fortement d'intensité et une bande apparaît dans le gel d'entassement. Le traitement avec la glutaraldéhyde permet d'éliminer toutes les bandes du gel de séparation et de voir une bande intense dans le gel d'entassement. La transglutaminase fait disparaître les bandes à >200 kDa, 80 kDa et 40 kDa mais non celle à 25 kDa. Une bande intense dans le gel d'entassement est décelable pour le traitement avec la transglutaminase. Le traitement de la protéine par les trois méthodes donne sensiblement le même résultat que pour le traitement avec la glutaraldéhyde.

La figure 12 démontre pour la protéine caséinate de calcium non traitée quatre bandes intenses avec des poids moléculaires d'environ 67 kDa, 35kDa, 33 kDa et 16 kDa. Suite à la thermocondensation, ces bandes caractéristiques baissent légèrement d'intensité et une faible bande apparaît dans le gel d'entassement. Le traitement avec la glutaraldéhyde et la transglutaminase permet d'éliminer toutes les bandes du gel de séparation et de voir une bande intense dans le gel d'entassement. Le traitement de la protéine par les trois méthodes donne sensiblement le même résultat que pour le traitement avec la glutaraldéhyde et la transglutaminase.

Le chromatogramme de la figure 13 démontre la présence de deux pics pour l'isolat de protéines de soja correspondant à des protéines estimées à environ 1500 kDa et 40 kDa. Lorsque la protéine IPS n'est pas traitée, le pic à 40 kDa est prédominant. Lorsque la protéine est traitée par la chaleur, le pic à 40 kDa semble diminuer et le pic à 150 kDa semble augmenter légèrement. Par contre, suite au traitement avec la glutaraldéhyde, le pic à 40 kDa disparaît et le pic à 1500 kDa est élevé. Le même phénomène se produit pour la transglutaminase malgré la présence d'un petit pic à 40 kDa qui pourrait correspondre à la bande aperçue sur le gel à environ 25 kDa. Lors du multiple traitement, le même phénomène que pour le traitement avec glutaraldéhyde se produit.

Le chromatogramme de la figure 14 montre la présence d'un pic pour le caséinate de calcium non traitée estimé à environ 33 - 35 kDa. Lorsque cette protéine est traitée à la chaleur, il semble se produire un déplacement du pic vers la gauche soit à un poids évalué à environ 1000 kDa. Suite au traitement avec la glutaraldéhyde ou la transglutaminase, le pic à 1000 kDa est toujours présent et le pic à 33 - 35 kDa disparaît. Le même phénomène se produit lorsque les trois traitements sont combinés.

Suite à ces observations, il est évident que les protéines IPS et caséinate de calcium réticulent fortement en présence de la glutaraldéhyde ou de la transglutaminase. Toutefois, à la lumière des résultats de l'étude de la diffusion d'huile, une augmentation réticulation ne correspond pas nécessairement à une augmentation de l'efficacité de l'enrobage.

8. Discussion

Les aliments composés de matières grasses peuvent se détériorer rapidement par l'oxydation des acides gras insaturés et la diffusion d'huile. L'amande enrobée de chocolat est un aliment qui illustre bien ce problème. Il a été démontré que l'amande enrobée de chocolat change de saveur après un certain temps. Ce phénomène est causé par la diffusion d'huile de l'amande vers l'enrobage de chocolat qui en plus de devenir plus mou, change de saveur par oxydation des acides gras de l'huile d'amande. L'entreposage de ce produit se fait habituellement à la température de la pièce (17-23°C) à laquelle la diffusion peut se produire rapidement. En fait, plus la température de la pièce augmente, plus cette diffusion se fait rapidement. Donc le but de ce projet de recherche consistait à élaborer un enrobage à base de protéines laitières ou de soja et de polysaccharides pouvant prévenir la diffusion d'huile de l'amande vers le chocolat et ainsi augmenter la durée de vie du produit.

L'utilisation de protéines laitières ou de soja comme base pour l'enrobage est intéressante car elle permet d'élaborer un enrobage peu coûteux. L'isolat de protéine du lactosérum et le caséinate de calcium ont été les protéines laitières étudiées comme base pour l'enrobage. L'isolat de protéine de soja a été la protéine provenant du soja étudiée pour la formulation d'enrobage.

Afin d'éviter les différences sensorielles occasionnées par la présence du film à base de protéines, il est important d'utiliser une bonne concentration de polyol. Un de ces polyols est le glycérol qui agit comme un agent plastifiant ayant des groupements hydroxyles. Ces petites molécules de nature hydrophile peuvent s'intercaler entre les chaînes protéiques en diminuant les interactions intermoléculaires permettant d'augmenter la flexibilité, l'élasticité et la résistance au stress du film. De plus, ce polyol est fortement utilisé dans l'industrie alimentaire. Une grande concentration de glycérol permettra de réduire la quantité d'eau libre dans la solution d'enrobage par la formation de ponts hydrogènes avec les molécules d'eau. L'eau de la solution d'enrobage, lorsque les cacahuètes sont trempées, est fortement absorbée par ces dernières et les amollit

grandement changeant ainsi les caractéristiques sensorielles. Afin de résoudre ce problème, la concentration de glycérol a été augmentée par rapport à la concentration utilisée par Ressouany (1997).

Dans la première étude de la diffusion d'huile, le glycérol a été ajouté à la solution à base de protéines. En s'intercalant entre les protéines, le glycérol permet une certaine flexibilité et élasticité à l'enrobage. Une grande concentration de ce polyol semble nécessaire afin de diminuer les changements sensoriels occasionnés par la présence de La présence d'une concentration de 10 % de glycérol semble l'enrobage. significativement favorable pour les enrobages à base d'isolat de protéine de soja, d'isolat de protéine du lactosérum et de caséinate de calcium par rapport au témoin. Lorsque la concentration de glycérol est augmentée à 20%, la diffusion d'huile augmente pour les enrobages à base d'isolat de protéine du lactosérum et de caséinate de calcium et diminue pour l'enrobage à base d'isolat de protéine de soja. La capacité du glycérol à s'intercaler entre les protéines pourrait être à l'origine de la baisse d'efficacité de l'enrobage en sa présence. Le glycérol pourrait augmenter la perméabilité de l'enrobage par la diminution de liaisons hydrophiles entre les protéines. Le glycérol devrait avoir moins d'impact sur les interactions entre ces molécules et de par sa nature hydrophile, pourrait être bénéfique à l'enrobage.

Les polysaccharides sont les molécules les plus utilisées pour produire des films ou enrobages étant donnée leur capacité à former des gels stables et rigides. Ces polymères sont aptes à préserver la qualité sensorielle des aliments, de limiter le rancissement des denrées sensibles à l'air, d'empêcher la migration des matières grasses et pour certains, de jouer le rôle d'un agent antimicrobien (Kester et Fennema, 1986). L'addition d'un polysaccharide qui a un caractère hydrophile dans la solution d'enrobage à base de protéines devrait améliorer son efficacité.

Le premier polysaccharide ajouté à l'enrobage à base de protéines a été le carboxyméthylcellulose. La cellulose est un poly-β-glucopyranoside aliphatique lié au niveau du C₄, contenant environ 3000 unités monomères et présentant une masse molaire

de 500 000 Da. Une des caractéristiques intéressantes de la cellulose est sa tendance à aligner ces chaînes entre elles permettant ainsi une connection par de nombreuses liaisons hydrogènes (Kondo, 1998). Cette caractéristique permet la formation d'une structure extrêmement rigide. Le carboxyméthylcellulose est un dérivé estérifié de la cellulose. Ce dérivé est formé par l'action du monochloroacétate de sodium sur l'alcali-cellulose et, lorsque sous forme d'un sel, devient soluble dans l'eau. Les films à base de ce polymère sont transparents, flexibles et résistants à l'absorption des matières grasses (Kester et Fennema, 1986). Ce polysaccharide, par la présence de groupements carboxyles dans sa chaîne est cationique en solution.

Ce polysaccharide diminue significativement la diffusion d'huile pour les enrobages à base d'isolats de protéines de soja et de caséinate de calcium par rapport à un enrobage sans carboxyméthylcellulose. Cette efficacité accrue de l'enrobage en présence de ce polysaccharide pourrait être causée par la présence de groupements carboxyles chargés. Par la formation d'interactions intermoléculaires électrostatiques ou non électrostatiques avec les protéines, un réseau de liaisons peut se former. Ce réseau pourrait restreindre l'espace nécessaire au passage des acides gras. Par contre, les intéractions ioniques entre les protéines et les polysaccharides cationiques sont faibles à pH neutre. À ce pH, les protéines isolat de protéines de soja et caséinate de calcium ont une charge globale négative car le point isoélectrique est situé entre 5-7 pour l'isolat de protéines de soja et de 4.6 pour le caséinate de calcium mais, il subsiste des plages chargées positivement qui permettent une intéraction ionique avec les polysaccharides cationiques (Schmitt et al., 1998). Ces zones chargées positivement sont dues principalement aux acides aminés suivants : lysine, arginine, et histidine. Ces dernières possèdent un groupement R ayant un groupement aminé. Donc ces nouvelles interactions pourraient permettre la présence d'un enrobage plus intègre en réduisant la quantité de trous nécessaires au passage des acides gras.

L'addition d'un second polysaccharide à l'enrobage semble une avenue intéressante étant donnés les résultats obtenus avec le carboxyméthylcellulose. La pectine est un polysaccharide dont l'unité répétitive est l'acide D-galacturonique avec des liaisons

 $\alpha(1\rightarrow 4)$. Ce polysaccharide est particulièrement abondant dans les fruits et se retrouve principalement dans les membranes cellulaires et les matières intercellulaires des plantes. La pectine a une faible teneur en groupements méthoxyles et forme des gels stables et rigides en présence d'ions calcium. Les films à base de pectine jouent un rôle important dans l'empêchement de la perte d'eau des aliments et surtout dans la migration des matières grasses (Kester et Fennema, 1986). La présence de groupements polaires comme les groupements méthoxyles, carboxyles et hydroxyles dans l'acide D-galacturonique devrait améliorer le réseau d'interactions dans l'enrobage à base des protéines isolat de protéine de soja et caséinate de calcium (Imeson, 1977). De par la présence de plages positives sur les protéines, il est possible de former de nouvelles interactions avec les groupements chargés négativement sur la pectine (Schmitt et *al.*, 1998).

La présence de pectine dans les enrobages d'isolats de protéines de soja et de caséinate de calcium ne donne pas les résultats escomptés. La pectine augmente la diffusion d'huile des enrobages à base d'isolat de protéine de soja et de caséinate de calcium par rapport aux enrobages sans pectine. Ce phénomène peut être causé par la perte de liaisons entre le carboxyméthylcellulose et les protéines en présence de la pectine. Cette perte d'interactions pourrait causer une diminution de l'intégrité de l'enrobage et ainsi permettre une plus grande surface pour la diffusion des acides gras.

L'amidon, polysaccharide autre que la pectine a aussi été étudié. L'addition d'amidon dans les enrobages à base d'isolat de protéine de soja et de caséinate de calcium semblait profitable selon une étude de Fennema (1993). Cette dernière étude démontre la migration de lipides n'est pas détectable après 31 jours à 30°C pour des cacahuètes enrobées d'un enrobage à base d'amidon hydroxypropylé (Fennema, 1993).

L'amidon est un polyglucose dont les connexions sont dues à des liaisons acétaliques a. Le maïs, la pomme de terre, le blé et le riz sont les principales sources d'amidon. Les deux principaux constituants de l'amidon sont : l'amylose (20%) et l'amylopectine (80%). L'amylose contient quelques centaines d'unité de glucose par molécule dont la masse molaire peut varier entre 150 000 et 600 000 Da. Ce constituant de l'amidon ne possède pas de ramification. De plus, il présente une structure différente de la cellulose. Cette différence se situe au niveau des carbones anomériques qui poussent la molécule d'amylose à adopter un arrangement polymérique hélicoïdal.

L'amylopectine est une chaîne ramifiée présentant toutes les vingt unités de glucose, un branchement au départ du C₆ et qui possède une masse molaire de l'ordre du million.

L'amidon est grandement utilisé dans l'industrie alimentaire dû à son faible coût et à ses propriétés fonctionnelles (Kester et Fennema, 1986). En général, les emballages à base d'amidon sont très rigides, opaques et sensibles à l'eau. L'amidon possède des groupements polaires (hydroxyles) dans sa chaîne qui pourraient favoriser la formation d'interactions non électrostatiques avec les protéines et d'autres polysaccharides et ainsi améliorer l'étanchéité des solutions d'enrobage aux acides gras.

Contrairement à la pectine, la présence d'amidon dans les enrobages n'augmente pas la diffusion d'huile. Pour l'enrobage à base de caséinate de calcium, l'amidon n'améliore pas significativement l'efficacité. Toutefois, pour l'enrobage à base d'isolat de protéine de soja, la présence de ce polysaccharide est significativement bénéfique. L'amidon est une très grosse molécule qui pourrait compenser pour les pertes d'interactions entre les protéines et le carboxyméthylcellulose et ainsi conserver l'intégrité de l'enrobage.

La dernière étude de la diffusion d'huile portait sur l'effet de la réticulation des protéines IPS, IPL et caséinate de calcium. Ce phénomène peut se produire selon trois méthodes : physique (chaleur et irradiation), chimique (molécule permettant la liaison entre les protéines) et enzymatique. Selon McHugh (1994), la chaleur provoquerait le déploiement des protéines et ainsi favoriserait la formation de liaisons covalentes interou intramoléculaires. Ce phénomène nommé thermocondensation est l'oxydation des groupements sulfhydryles des cystéines qui, lorsque chauffés à une certaine température,

peuvent former des liaisons intermoléculaires de type disulfure. Plus spécifiquement, ce processus permet de linéariser les protéines pour que les groupements thiols intraglobulaires soient exposés et ainsi, faciliter la formation des ponts disulfure. L'isolat de protéine de soja et l'isolat de protéine du lactosérum possèdent plusieurs cystéines dans leur structure mais le caséinate de calcium, lui, possède très peu de cet acide aminé qui fournit les groupements thiols nécessaires à la réticulation. La réticulation des protéines IPS et IPL a été démontrée par Hoffman (1997). Ces études ont démontré qu'un traitement à 90°C pendant environ 30 minutes pour l'isolat de protéine de soja et un traitement à 80°C pendant 30 minutes pour l'isolat de protéine du lactosérum permet la formation de ponts intermoléculaires entre les protéines. Une autre étude a démontré que le traitement à la chaleur du caséinate de calcium donne un produit faiblement réticulé. Cependant, il a été démontré que le caséinate de calcium réticule fortement lorsqu'il est traité par irradiation (Letendre, 1999).

Les résultats par chromatographie d'exclusion et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide démontrent une légère réticulation de la protéine IPS lorsque traitée à la chaleur. La réticulation par thermocondensation de cette protéine permet d'améliorer l'efficacité de l'enrobage face à la diffusion d'huile. Cette amélioration de 42 % par rapport à la protéine non traitée est probablement due à la formation d'un réseau d'interactions plus grand entre les protéines par la formation de nouvelles liaisons intermoléculaires de type disulfure (Sabato, 2001). Pour la protéine caséinate de calcium, une plus faible réticulation est démontrée par chromatographie d'exclusion et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le traitement à la chaleur de cette protéine ne semble pas diminuer la diffusion d'huile par rapport à un enrobage avec la protéine n'ayant pas été traitée. La réticulation ne semble pas former suffisamment d'interactions de type disulfure pour être capable de bloquer les acides gras.

Selon les résultats de la chromatographie d'exclusion et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, la réticulation des protéines IPS et caséinate de calcium avec la glutaraldéhyde augmente clairement le poids de ces protéines. Cette augmentation semble plus grande que le traitement à la chaleur. Malgré une réticulation plus grande de

ces protéines, l'efficacité de l'enrobage face à la diffusion d'huile semble diminuer. Ce phénomène peut s'expliquer par un enrobage trop rigide qui avec le temps va former des fissures.

Les résultats de la chromatographie d'exclusion et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide montrent également que la transglutaminase réticule fortement les protéines IPS et caséinate de calcium. Cette méthode de réticulation ne semble pas améliorer l'efficacité de l'enrobage pas rapport aux enrobages traités seulement à la chaleur malgré une réticulation plus grande pour les protéines avec enzyme. Pour les mêmes raisons, il est probable qu'une forte réticulation de ces protéines donne un enrobage très rigide qui se fissure probablement dans le temps.

Finalement, un enrobage à base des protéines IPS ou caséinate de calcium traitées seulement à la chaleur diminue la diffusion d'huile par rapport à l'enrobage commercial. Donc on peut s'attendre à ce que ces enrobages augmentent le temps de vie de ce produit.

9. Conclusion

La diffusion d'huile de l'amande ou de l'arachide vers l'enrobage de chocolat est un phénomène qui diminue le temps de vie de ce produit lorsqu'entreposé à la température de la pièce. L'insertion d'un enrobage à base de protéines laitières ou de soja entre l'amande et le chocolat semble être une barrière efficace au passage de l'huile. L'ajout d'un polysaccharide chargé, comme le carboxyméthylcellulose, semble améliorer l'efficacité de l'enrobage face à la diffusion d'huile. La formation de liaisons électrostatiques ou non électrostatiques semble augmenter l'étanchéité du film et permet ainsi de diminuer le passage des acides gras. La réticulation des protéines a été démontrée par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par chromatographie d'exclusion. Ces techniques démontrent que l'isolat de protéines de soja et le caséinate de calcium réticulent légèrement par thermocondensation et fortement en présence de glutaraldéhyde et de transglutaminase. Selon les résultats obtenus avec le test de diffusion à une température d'entreposage de 30°C pendant 12 semaines, une forte réticulation de ces protéines ne semble pas améliorer l'efficacité de l'enrobage. Les enrobages à base de IPS ou de caséinate de calcium traités à la chaleur ont donné les meilleurs résultats par rapport aux enrobages traités par les autres méthodes de réticulation. Ces enrobages diminuent significativement la diffusion d'huile par rapport à la solution d'enrobage actuellement utilisée commercialement.

10. Bibliographie

Acharya, K.R., Stuart, D.I., Phillips, D.C., Scheraga, H.A. 1990. A critical evaluation of the predicted and x-ray structure of α -lactalbumine. J Protein Chem 9: 549-63.

AOAC. 1984. Cis, cis-methylene interrupted polyunsaturated fatty acids in oils spectrophotometric method. 979.19: 517-8.

Avena-Bustillos, R.J., Krochta, J.M. 1993. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium cross-linking and lipid content. J Food Sci 58 (4): 904-7.

Bernal, V.M., Smajda, C.H. Smith, J.L., Stanley, D.W. 1987. Interactions in protein/polysaccharide/calcium gels. J Food Sci 52 (5): 1121-36.

Beckett, S.T. 1994. Industrial Chocolate Manufacture and Use. Blackie. London. 110 pages

Beckett, S.T. 1990. Chocolate coated rework. Manuf Confect 70 (5): 113-9.

Brabbs, W.J. 1986. Process for making a baked filled snack product. US Patent 4,596,714 June 24.

Brault, D., D'Aprano, G., Lacroix, M. 1997. Formation of free-standing sterilized edible-flims from irradiated caseinates. J Agric Food Chem 45: 2964-69.

Cakebread, S.H. 1972. How to control migration in composite products. Candy and Snack Industry 137 (5): 42 et 79.

Campbell, L.B., Keeney, P.G. 1968. Developments in fat bloom research on dark chocolate coatings. Manuf Confect 48: 77.

Cebula, D.J., Dilley, K.M., Smith, K.W. 1991. Continuous tempering studies on model confectionery systems. Manuf Confect 131:15.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. 1985. Protéines alimentaires. Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modification chimique. Technique et documentation-Lavoisier, Paris, France.

Fennema, O.R., Kester, J.J. 1993. Edible coatings to inhibit lipid migration in a confectionery product. J Food Sci 58 (6): 1422-5.

Fennema, O.R., Nelson, K.L. 1991. Methylcellulose films to prevent lipid migration in a confectionery products. J Food Sci 56 (2): 504-9.

Folk, J.E., Chung, S.I. 1973. Advances in enzymology, vol. 38, ed. by A. Meister, John Wiley and Sons Inc. New York, NY. 109 pages.

Gennadios, A., Rhim, J.W., Handa, A., Weller, C.L., Hanna, M.A. 1998. Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. J Food Sci 63: 225-8.

Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.L. 1993. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. J Food Sci 58: 206-11.

Hajdu, J., Friedrich, P. 1975. Reaction of glutaraldehyde with NH₂ compounds. Analytical Biochem **65**: 273-80.

Hoffman, M. A. M., Sala, G., Olieman, C., De Kruif, K. G. 1997. Molecular mass distributions of heated-induced β -lactoglobulin aggregates. J Agric Food Chem 45: 2949-57.

Imeson, A.P., Ledward, D.A., Mitchell, J.R. 1977. On the nature of the interactions between some anionic polysaccharides and proteins. J Sci Food Agric 28: 669-72.

Jokay, L., Nelson, G.E., Powell, E. 1967. Development of edible amylaceous coatings for foods. Food Technol 21 (8): 1064-6.

Kester, J.J., Fennema, O.R. 1986. Edible films and coating: a review. Food Technol 12: 47-59.

Kinsella, J.E., Shigeru, U. 1985. Forces involved in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S and soy isolate. J Food Sci 50: 1278-82.

Krochta, J.M., De Mulder-Johnson, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities, Food Technol **51** (2): 61-74.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-5.

Letendre, M. 1999. Utilisation de protéines laitières pour la fabrication de pellicules d'emballage et d'enrobage biodégradables et caractérisation de leur réticulation. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, IAF, Laval. 156 pages.

Le Tien, C., Letendre, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.A., Delmas-Patterson, G., Yu, H.L., Lacroix, M. 2000. Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. J Agric Food Chem 48: 5566-75.

Lovegren, N.V., Gray, M.S., Feuge, R.O. 1976. The effect of liquid fat on melting point and polymorphic behaviour of cocoa butter and cocoa butter fractions. J Am Oil Chem Soc 52: 108.

Mamoud, R., Savello, P.A. 1992. Mechanical properties and water vapor transferability through whey protein films. J Dairy Sci 75: 942-6.

McHugh, T.H., Krochta, M. 1994. Milk-protein-based edible films and coatings. Food Technol **January**: 97-103.

McHugh, T.H., Aujard, J.F., Krochta, J.M. 1994. Plasticized whey protein edible films: water vapor permeability properties. J Food Sci 59: 416-9, 423.

Minson, E. 1990. Cookie confectionery combinations. Manuf Confect 70 (5): 121-6.

Motoki, M., Aso, H., Seguro, K., Nio, N. 1987. αs-1-Casein film preparation using transglutaminase. Agric Biol Chem 51: 997-1002.

Nakano, A., Masaki, N. 1989. Migration inhibitor for fats and oils for baked cakes and process for producing composite baked cakes with the use of the same. US Patent 4,855,152 August. 8.

Nisperos-Carriedo, M.O. 1994. Edible coating and films based on polysaccharides. In: Edible films and coatings to improve food quality, (Baldwin, E., Krochta, J.M., Nisperos-Carriedo, M.O., ed.), Technomic publishing Co., inc., Lancaster, USA. 305-35.

Padley, F.B. 1994. Rancidity in confectionery fats, in Rancidity in Foods, Third ed. Blackie, London. 230-55.

Paulicka, F.R. 1973. Phase behavior of cocoa butter extenders. Chem Ind 17. 1 **September**: 835.

Peterssen, B. 1986. Pulsed NMR method for determining solid fat content, Part II: Cocoa butters and equivalents in blends with milk fat. Fette Seifen Anstrichm 88: 128.

Peyron, A. 1991. L'enrobage et les produits filmogènes : un nouveau mode d'emballage. Viandes Prod Carnés 12 : 41-6.

Ressouany, M., Vachon, C., Lacroix, M. 1999. Microbial resistance of caseinate films cross-linked by gamma irradiation. J Dairy Research 67: 1-6.

Sabato, S.F., Ouattara, B., Yu, H.L., D'Aprano, G., Le Tien, C., Mateescu, M.A., Lacroix, M. 2001. Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films J Agric Food Chem 49: 1397-403.

Sato, K. 1996. Polymorphism of pure triacylglycerols and natural fats. Advances in Applied Lipid Research, Vol. II JAI Press, New York, 213-68.

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Hardy, J. 1998. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. Critical Reviews Food Sci and Nutrition 38 (8): 689-753.

Shuleva, J.J. 1989. Monitoring and controlling oil migration in peanut butter confections. Manuf Confect 69 (5): 72-4.

Singh, H. 1994. Coss-linking of milk proteins on heating concentrated milk at 120 degree celsius. Dairy J: 477-89.

Talbot, G. 1989. Fat migration in confectionery products. Confect Prod October: 655-6.

Timms, R.E. 1984. Phase behaviour of fats and their mixtures. Prog Lipid Res 23:1.

Vachon, C., Yu, H.L., Yefsah, R., Alain, R., St-Gelais, D., Lacroix, M. 2000. Mechanical and structural properties of mik protein edible films cross-linked by heating and γ -irradiation. J Agric Food Chem 48: 3202-9.

Wacquez, J. 1975. Fat migration into enrobing chocolate. Manuf Confect 55 (2): 19-23, 26.

Wong, D.W.S., Camirand, W.M., Pavlath, A.E. 1996. Structures and functionalities of milk proteins. Cri Rev Food Sci Nutr 36: 807-44.

Wootton, M., Weeden, D., Munk, N. 1970. Mechanism of fat migration in chocolate enrobaed goods. Chem Ind 3: 1052-3.

Wu, L.C., Bates, R.P. 1972. Soy protein-lipids films. 1. Studies on the film formation phenomenon. J Food Sci 37: 36-9.

Yano, J., Ueno, S., Sato, K. 1993. FTIR study of polymorphic transformations in SOS, POP, POS. J Phys Chem 97: 12967-73.

Yildrim, M., Hettiarachchy, Kalapathy, U. 1997. Properties of biopolymers from cross-linking whey protein isolate and soybean 11S globulin. J Food Sci 62: 270-5.