

Valorisation de la graine d'arachide broyée : rôle des différentes fractions dans la structuration par gélification d'une suspension aqueuse

Benoît Basse

▶ **To cite this version:**

Benoît Basse. Valorisation de la graine d'arachide broyée : rôle des différentes fractions dans la structuration par gélification d'une suspension aqueuse. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASB006 . tel-03125492

HAL Id: tel-03125492
https://pastel.hal.science/tel-03125492

Submitted on 29 Jan 2021

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

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

université PARIS-SACLAY

Valorisation de la graine d'arachide broyée : rôle des différentes fractions dans la structuration par gélification d'une suspension aqueuse

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat: Génie des procédés
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, 91300, Massy, France
Référent : AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à Massy,

le 24 septembre 2020, par

Benoît BASSE

Composition du Jury

Claire GAUDICHON Professeure, AgroParisTech (UMR PNCA)	Présidente
Thomas CROGUENNEC Professeur, Institut Agro-Agrocampus Ouest (UMR STLO)	Rapporteur & Examinateur
Michèle DELALONDE Maître de Conférences, HDR, Université de Montpellier (UMR QualiSud)	Rapporteur & Examinatrice
Rémi SAUREL Professeur, AgroSup Dijon (UMR PAM)	Examinateur
Paul MENUT Professeur, AgroParisTech (UMR SayFood)	Directeur de thèse
Véronique BOSC Maître de Conférences, AgroParisTech (UMR SayFood)	Co-Encadrante & Examinatrice
Monique CHAN HUOT Responsable du laboratoire Tweed	Co-Encadrante & invitée

Thèse de doctorat

NNT : 2020UPASB006

À ma famille,
et tous ceux qui m'ont accompagné jusqu'ici

"Nothing is more important than passion.
No matter what you want to do with your life, be passionate."

Jon Bon Jovi

Remerciements

Avant de vous présenter les travaux effectués au cours de ce travail de thèse, je tiens à remercier ici toutes les personnes qui ont permis de faire de cette thèse l'expérience unique qu'elle a été pour moi.

Je souhaite avant tout remercier Michel Lescanne, Isabelle Lescanne Sauguet et Adeline Lescanne-Gautier qui m'ont accordé leur confiance et permis de faire de ce projet une réalité.

De même, je remercie le Groupe Nutriset et particulièrement l'entreprise Onyx Développement pour m'avoir accueilli et d'avoir encadré ce travail. Je remercie également AgroParisTech et l'UMR GENIAL (aujourd'hui UMR SayFood) qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires et leurs équipes pour cette collaboration.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, Claire Gaudichon qui a accepté de présider ce jury, Rémi Saurel, et Thomas Croguennec et Michèle Delalonde, qui ont également accepté de rapporter mon manuscrit. Vous avez chacun apporté un regard différent sur mes travaux et contribué à ma réflexion. J'ai beaucoup apprécié les échanges que nous avons eu lors de la soutenance.

Je tiens maintenant à remercier chaleureusement tous ceux qui, à un moment ou à un autre, m'ont accompagné au quotidien dans cette thèse, à commencer par mon encadrement.

Paul, Véronique, Marie-Noëlle, avant le début de la thèse déjà vous vous échangiez la patate chaude qu'allait devenir cette thèse pour savoir qui serait le plus à même de la diriger ; et je suivais depuis Rouen tous ces échanges avec chaque fois un nouveau nom dans la boucle qui s'apprêtait à rejoindre l'équipe. Merci à tous les trois pour tout ce que vous m'avez apporté au long de ces trois ans, aussi bien au niveau scientifique qu'au niveau personnel à travers tous nos échanges. Paul, j'ai toujours pu te trouver dans ton bureau pour une double (ou triple) vérification sur une question. Véronique, tu m'as appris à chaque étape à toujours pousser plus loin mes recherches et approfondir mes réflexions. Marie-Noëlle, tu as souvent revendiqué ton regard naïf sur cette thèse très « rhéologique », mais je n'en ai pas moins appris sur la recherche scientifique à tes côtés au cours de cette thèse.

Du côté d'Onyx Développement, c'est à Jean-Pierre, Jean-Marc et Jean-Baptiste, suivi de Monique par la suite, que la lourde tâche de m'encadrer a été confiée. Jean-Pierre, nous travaillions déjà ensemble avant la thèse, mais cette thèse fut néanmoins une expérience nouvelle pour chacun de nous. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de notre collaboration. Jean-Marc, c'est avec toi que j'ai

effectué à Onyx mes premiers pas dans le monde de la recherche, merci de m'avoir appris à rédiger un article scientifique, de m'avoir emmené en congrès et de m'avoir ouvert les portes de ton réseau. J'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés, maître métrologue. Jean-Baptiste, tu as également permis de lancer cette thèse et je te remercie pour le soutien que tu m'as communiqué, depuis mon stage dans ton équipe, jusqu'aux réflexions qui ont posées les fondations de ce projet. Enfin, je tiens à remercier Monique, tu as eu la lourde tâche de rejoindre le train en cours de route. Merci de toute l'implication dont tu as fait preuve malgré cela, tu as toujours mis un point d'honneur à pouvoir suivre ce projet au plus près afin de nous apporter ton expérience et tes conseils.

Merci à Adeline Boire d'avoir accepté de rejoindre cette équipe de choc à l'occasion des comités de thèse, et de m'avoir apporté tes conseils et un avis extérieur bienvenu lors de ces réunions. Merci également à Maxime Bohin, merci d'avoir suivi cette thèse depuis le début et de m'avoir apporté tes conseils et ton expérience autant lors de réunions que lors de discussions au cours de passages respectifs à Onyx/Nutriset.

Au cours de cette thèse, j'ai également été soutenu par de nombreuses stagiaires qui m'ont chacune permis d'avancer plus loin, plus vite dans mes recherches. Merci à Mélanie Ngo, Gabriela Zanghelini, Fatoumata Diaby Toure et Eszter Sarkadi pour l'aide que vous m'avez apporté, je vous souhaite tout le meilleur pour la suite, aussi bien professionnellement que personnellement.

J'ai eu la chance au cours de cette thèse d'évoluer au sein de deux équipes formidables.

Merci donc à toute l'équipe du laboratoire Tweed. Merci Fabien d'avoir animé le labo de ton chant inimitable, prêt à remonter le moral de l'équipe à chaque instant. Merci pilote d'avoir toujours été présent, même lorsque j'étais dans la lointaine capitale au milieu des parigots. Merci Laura, tu n'as pas été en reste en terme d'animation, que ce soit via le COS ou les tirs de balles, fléchettes et autres projectiles. J'ai toujours pu compter sur tous les deux pour un coup de pouce sur les manips également, merci à vous ! Mathilde, coach officiel des Tweeders, merci de m'avoir appris dès mon arrivée dans l'équipe le fonctionnement du labo et de l'entreprise (à savoir : qui appeler pour quel problème). Merci Rekha, j'ai toujours pu compter sur ton soutien de chaque instant, même à travers les continents. Salma, quelle joie ça a été lorsque j'ai appris que nous allions accueillir une docteure AgroParisTech dans l'équipe ! Merci pour tout le soutien et l'attention que tu m'as apportés. Merci à Jean-Paul a.k.a Géo Trouvetou, pionner de la transglutaminase ! J'ai énormément appris à tes côtés, ça a été un honneur de rédiger un brevet avec toi. Hubert, « collègue, ami, coloc, dans cet ordre », ça n'a pas été facile de savoir où te remercier. Mais tu es un membre indissociable de l'équipe Tweed et c'est là qu'a commencé notre aventure, alors commençons par le commencement. Au moment où la

thèse démarrait, nous étions déjà le duo de choc que tout le monde connaît, et j'ai toujours pu compter sur toi pour discuter rhéologie, biochimie et sens de l'existence. Tu as été présent pour partager chaque célébration et surmonter chaque perte de vitesse. Pour tout cela, je te remercie.

Merci aussi à tous ceux qui ont fait de mon séjour à Onyx Développement une expérience aussi enrichissante et agréable, Pierre, Cyprien, Trewis, Alexis, Lamisse, Dominique, Sylvia, Aurélie, Claire, Cécilia, Laetitia, Raphaëlle, Laurence, Adrien et les collègues de Nutriset, Loïc Petigny, John Downes, et toute l'équipe R&D Nutriset. Mention spéciale pour Chloé, on s'est suivi en stage, puis en CDD, puis en thèse respectivement à Onyx et Nutriset. Ça nous emmené en Malaisie puis au Népal à l'occasion des congrès. Bref, tout un tas d'épreuves et de souvenirs communs ! Merci d'avoir été là pour partager chacune de ces étapes.

Un grand merci également à l'équipe SP2 pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont fait à mon arrivée au laboratoire. Merci Brigitte, je n'ose imaginer ce que serait cette équipe sans toi, pas plus que je n'ose compter le nombre de fois où je suis venu te voir pour te demander un coup de main. Pablo, les mots fléchés niveau 4 c'est devenu possible grâce à toi, un grand merci pour cela. Merci Cassandre pour ta bonne humeur si communicative, un rayon de soleil dans les couloirs de l'équipe ! Gabi, merci pour toutes ces longues discussions et ces rires partagés lors de nos séances microscopie, à l'affût d'un réseau de protéines. Merci Sophie et Giana pour votre bonne humeur et nos discussions matinales autour d'un bon café.

Merci à Séverine et Paola pour toute l'aide que vous m'avez apporté lors de mes passages en Calipro, j'ai beaucoup appris à vos côtés.

Merci à toutes celles et ceux avec qui j'ai pu partager café, déjeuner et discussion de couloirs et qui ont participé à faire de ces 3 ans une expérience si agréable : Delphine, Gérard, Marco, Christelle, Murielle, Jacqueline, Dominique, Samir, Even, Nicolas, Stéphanie et Barbara.

Enfin, un grand merci à celles et ceux qui ont rythmé aussi bien les journées que les soirées de ces 3 ans, j'ai nommé les doctorants SP2 (et Kevin). Le café a bien meilleur goût lorsqu'il se déguste en bonne compagnie autour de mots fléchés. Merci à ceux qui ont marqués mon arrivée au labo, et qui m'ont tant appris. Merci Anne-Flore pour tous les échanges qu'on a eu autour de la thèse et autres vicissitudes de la vie, aussi bien au labo qu'en dehors. Marine, merci pour ta douceur et ta gentillesse, toujours prête à aider les autres. Charlotte, merci pour toutes tes histoires en salles de pause et tes bons plans, toujours prête à alléger l'ambiance avec ton rire si communicatif. Kevin, merci pour tous les échanges qu'on a eu, j'ai pu compter sur toi en toutes circonstances pour un bon conseil, un bon verre, un bon jam ou une bonne discussion. Mathieu, quoi que tu dises, il ne fait pas si froid à Oléron.

Maintenant qu'on est d'accord là-dessus, merci pour tous les délires qu'on a eu, de mousses et de gels lors de tes apparitions hebdomadaires et de mousses et de whiskys plus tard lors des soirées. Valérie, quelle belle découverte tu as été dans cette thèse. Tu as apporté dans l'équipe toute une culture québécoise et j'espère qu'on se retrouvera encore souvent autour d'une poutine, d'un match de hockey, ou même d'une simple bière (une Fin du Monde, cela va de soi). Merci pour cette belle amitié que nous avons tissé. Laurena, nous avons partagé un bureau pendant toute cette thèse, mais pas seulement. Merci pour les coups de mains et les conseils au labo, pour les séances de sport et les barbecues à Massy, pour les sorties diverses et les soirées toujours plus sympas dans Paris. J'ai toujours pu compter sur ma binôme de choc.

D'autres doctorants ont par la suite rejoint l'équipe et participé à la vie du labo. Alban, tu as été le premier à rejoindre et tu as vite su suivre, autant sur le mot fléché de la journée que sur le verre de la soirée. Tu as vite été rejoint par toute une troupe venue d'Italie, d'Inde et du Royaume-Uni, avec Francesca, Arnesh, Pietro et Solomon. Merci à tous, bien plus qu'une dimension internationale, vous avez apporté avec vous des supers rencontres et beaucoup de fraîcheur à notre équipe.

Merci également aux doctorants hors-SP2. Aurélia, Jeehyun et Julie, merci pour tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés au labo dans mes premiers pas de doctorants, et à tous les moments passés ensemble en soirée. Svenja et Keivan, mon séjour à la MINA aurait été bien vide sans vous pour l'égayer au travers d'apéros, de pique-niques, de parties de volley et de badminton, et de toutes les soirées et discussions qu'on a partagées, merci à tous les deux. Enfin, merci à Véronique, Thibaut, Eugénie, Carole, Hakyoung, Hajar et Benjamin pour tous les bons moments partagés au détour d'évènements d'équipes, de JDD, de discussions de couloirs et de soirées doctorantes.

Yurixy, tu es arrivée au temps délicat de la rédaction. Merci pour tout le soutien que tu m'as apporté dans cette étape difficile et que tu m'apportes encore aujourd'hui. Une autre belle page écrite cette année, et encore beaucoup d'autres à écrire ensemble.

Enfin, merci à mes parents, mon frère et ma sœur pour leur soutien, ainsi qu'à tous mes amis sur qui j'ai pu compter au cours de ces trois années et qui ont supporté mes longues oraisons sur l'arachide. Je conclurai ces remerciements par un merci spécial à mes colocataires qui m'ont supporté pendant cette thèse et qui m'ont tant soutenu : Hubert, Romain(s), Rosanna et Amandine, merci à vous !

Sommaire

Abréviations 12
Liste des figures 14
Liste des tableaux 19
Introduction générale 21
Chapitre I : Etude bibliographique 4
I.1 Description, organisation et composition de la graine d'arachide 5
I.1.1 Description de la graine d'arachide 5
I.1.2 Organisation d'une graine d'arachide 6
I.1.2.1 Organisation générale 7
I.1.2.2 Grains d'amidon 8
I.1.2.3 Sphérosomes 8
I.1.2.4 Aleurones 10
I.1.3 Composition biochimique de la graine d'arachide 10
I.1.3.1 Profil en acide gras de la graine d'arachide 10
I.1.3.2 Profil glucidique de la graine d'arachide 12
I.1.3.3 Profil protéique de la graine d'arachide 13
I.1.3.4 Micro-constituants des graines d'arachide 15
I.2 Solubilité et extraction des protéines de légumineuses 18
I.2.1 Prétraitement du fruit jusqu'à la graine dépelliculée 18
I.2.2 Traitements à sec de la graine dépelliculée 19
I.2.3 Solubilisation et extraction des protéines 22
I.2.3.1 Solubilisation des protéines 22
I.2.3.2 Fractionnement des protéines solubilisées 25
I.3 Propriétés fonctionnelles et structuration de systèmes protéiques 28
I.3.1 Propriétés gélifiantes 29
I.3.1.1 Gélification thermique 30
I.3.1.2 Gélification par acidification 33
I.3.1.3 Gélification par traitement enzymatique 35
I.3.1.4 Gélification des protéines d'arachide : bilan des travaux déjà réalisés 37
I.3.1.4 Théorie fractale et gélification des protéines 39
I.3.2 Impact d'une phase dispersée lors de la gélification d'une solution de protéines 40
I.3.3 Gélification de matrices protéiques contenant des polyoses 44
I.3.4 Propriétés interfaciales des protéines 48
Chapitre II : Stratégie de recherche 51
Chapitre III : Matériels et Méthodes 55
III.2 Matières premières et réactifs 56
III.3 Méthodes 56
III.3.1 Transformation de la graine 56
III.3.1.1 Broyage 56
III.3.1.2 Préparation de la suspension 57
III.3.1.3 Fractionnement des composants du mix par centrifugation 58
III.3.1.3.1 Fractionnement « standard » 58
III.3.1.3.2 Fractionnement pour l'extraction « douce » du surnageant 58
III.3.1.3.3 Fractionnement pour l'extraction « propre » du culot 61
III.3.1.4 Préparation d'extraits protéiques de concentration et de force ionique maîtrisées 62
III.3.1.4.1 Préparation d'un concentrat protéique 62
III.3.1.4.2 Préparation d'une solution de protéines de concentration et de force ionique maîtrisées 63

III.3.2 Analyse biochimique de la suspension....63
III.3.2.1 Mesures de stabilité de la graine et du broyat....63
III.3.2.2 Détermination de la matière sèche....64
III.3.2.3 Extraction et quantification des lipides....64
III.3.2.4 Quantification des protéines par la méthode de Kjeldahl....65
III.3.2.5 Dosage des protéines solubles par spectrophotométrie....65
III.3.2.6 Dosage des groupements SH des protéines de la fraction intermédiaire....66
III.3.2.7 Mesure de l'hydrophobicité de surface des extraits protéiques....66
III.3.2.8 Analyse du profil protéique de la fraction intermédiaire par électrophorèse SDS-PAGE....67
III.3.3 Analyse structurale de la suspension et de ses fractions....68
III.3.3.1 Mesure de taille....68
III.3.3.1.1 Mesure des tailles par diffraction laser....68
III.3.3.1.2 Mesure des tailles par diffusion dynamique de rayonnement....68
III.3.3.2 Observation microscopique....69
III.3.3.2.1 Microscopie optique....69
III.3.3.2.2 Microscopie optique confocale laser....69
III.3.3.3 Analyse de la sédimentation des échantillons....70
III.3.4 Mesures des propriétés mécaniques et rhéologiques des gels....70
III.3.4.1 Caractérisation des propriétés rhéologiques....70
III.3.5 Tests statistiques....73
Chapitre IV : Caractérisation de la suspension d'arachide et de sa capacité gélifiante....74
IV.1 Composition biochimique du broyat et de la suspension....75
IV.2 Distribution des composants dans les différentes fractions et structure des différentes phases....79
IV.2.1 Répartition des composants dans les différentes fractions....79
IV.2.2 Etude du surnageant....82
IV.2.3 Etude de la fraction intermédiaire....84
IV.2.4 Etude du culot....87
IV.3 Capacité gélifiante de la suspension....89
IV.4 Propriétés rhéologiques et structurales d'un gel de suspension d'arachide obtenu par traitement thermique précédé ou non d'un traitement enzymatique....95
Chapitre V : Gélification et propriétés de gels formés à partir des protéines d'arachide extraites dans la phase intermédiaire....102
V.1 Effets combinés de la force ionique et d'un prétraitement enzymatique dans la gélification thermique d'extraits de protéines d'arachide....104
V.1.1 Introduction....104
V.1.2 Materials & Methods....106
V.1.2.1 Materials....106
V.1.2.2 Methods....106
V.1.2.2.1 Sample preparation....106
V.1.2.2.2 Protein characterization....107
V.1.2.2.3 Gelation and gel characterization....108
V.1.3. Results and discussion....110
V.1.3.1 Protein extracts characterization....110
V.1.3.2 Gelation and rheological properties....111
V.1.3.2.1 Evolution of the rheological properties during gelation....111
V.1.3.2.2 Sol-gel transition....114
V.1.3.2.3 Fractal-like scaling of the storage modulus....115
V.1.3.3 Gels microstructure....118
V.1.4. Conclusion....120
V.2 Résultats complémentaires....121

V.2.1 Etude de l'impact de la lyophilisation sur les propriétés physico-chimiques et rhéologiques de la fraction intermédiaire 121
V.2.2 Etude de l'impact du traitement enzymatique sur l'agrégation des protéines d'arachide 124
Chapitre VI : Rôle des fractions dispersées dans les processus de gélification 127
VI.1 Effets de l'incorporation de corps lipidiques sur les propriétés des gels de protéines 128
VI.1.1 Evolution des cinétiques de gélification en fonction de la fraction volumique en lipides 129
VI.1.2 Effet de la fraction volumique en lipide sur les propriétés rhéologiques finales des gels....133
VI.1.3 Etude de la microstructure 136
VI.2 Etude de la gélification du culot en présence ou non de protéines solubles 141
VI.2.1 Etude de la capacité gélifiante du culot 142
VI.2.2 Propriétés rhéologiques des gels formés à partir du culot 146
VI.2.3 Etude de la microstructure des gels 148
Conclusion générale et perspectives 153
Valorisations scientifiques 161
Références 162
ANNEXES 183
Annexe I : Propriétés de la transglutaminase 184
Annexe II : Caractérisation des gels par mesure de texture 184
Annexe III : Caractérisation texturale des mix gélifiés 187
Annexe IV : Comparaison entre mesures rhéologiques et propriétés texturales sur des gels de protéines 188
Annexe V : Caractérisation par microscopie confocale des mélanges surnageant/fraction intermédiaire avant gélification 189

Abréviations

ANS : 1-Anilino-8-NaphtalenSulfonate

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

ASE : Accelerated Solvent Extraction (Extraction accélérée par solvant)

A/E : Air/Eau

CSLM: Confocal Laser Scanning Microscope (Microscope confocal à balayage laser)

Df: Dimension fractale

DTNB: 5,5'-Dithiobis-(2-NitroBenzoic acid) (Acide 5,5'-(2-nitrobenzoïque))

EDTA: Ethylene DiaminoTetraacetic Acid (Acide éthylènediaminetétraacétique)

FAO: Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)

GAE: Gallic Acid Equivalent (Equivalent acide gallique)

GDL: D-Glucono-δ-Lactone

H/E : Huile/Eau

HO : High Oleic (Riche en acide oléique)

HPLC : High Performance Liquid chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance)

IFR : Intensité de Fluorescence Relative

LDL : Low-Density Lipoprotein (Lipoprotéine de faible densité)

LVE : Limite de linéarité viscoelastique

mTG : Microbial Transglutaminase (Transglutaminase microbienne)

PD-CAAS : Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (Score chimique corrigé de la digestibilité)

pHi : Point isoélectrique

SDS-PAGE: Sodium dodécyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium)

USDA: United States Department of Agriculture (Département de l'agricultures des Etats-Unis)

WHO: World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

Liste des figures

Figure I.1 : Arachide présentée dans et hors de sa cosse, enveloppée de sa pellicule et dépelliculée .7
Figure I.2 : Micrographie électronique d'une coupe transversale de cellule du parenchyme de cotylédon d'arachide 8
Figure I.3 : Schéma d'une coupe de sphérosome, d'après le modèle de Tzen (2012) 9
Figure I.4 : Profil en acides gras de différentes variétés d'arachide 11
Figure I.6 : Composition en acides aminés des différentes variétés d'arachide.....14
Figure I.7 : Composition en minéraux de la graine d'arachide et d'autres légumineuses. Les valeurs sont présentées pour 100g de graine fraîche 15
Figure I.8 : Composition en vitamines de la graine d'arachide et d'autres légumineuses 15
Figure I.9 : Apport de l'arachide en micronutriments par rapport aux références nutritionnelles de l'USDA et de l'Union Européenne 16
Figure I.10 : Impact du traitement thermique sur l'allergénicité des protéines de légumineuses 20
Figure I.11 : Procédés de séparation en voie sèche applicable aux graines de légumineuses en voie sèche et leurs applications 21
Figure I.12 Courbes de solubilité des globulines de l'arachide en fonction du pH dans de l'eau (A) et dans une solution saline (NaCl 0,2 mol/L).....23
Figure 1.13: Solubilisation et précipitation des protéines par salting in et salting out 24
Figure I.14 : Série de Hofmeister (A) et propriétés des ions kosmotropes et chaotropes (B).....25
Figure I.16 : Gélification de β-lactoglobuline par traitement thermique : impact du pH sur la structuration du gel au cours du traitement. 31
Figure I.17: Représentation de la gélification par acidification de protéines de sérum laitier (en haut) et d'ovalbumine (en bas) 34
Figure I.18 : Mécanismes réactionnels de réticulation des protéines par des oxidoréductases.....35
Figure I.19 : Réactions catalysées par la transglutaminase d'origine microbienne (mTG) : (a) transfert d'un groupement acyl en position N-terminale d'une protéine ; (b) formation de liaisons covalentes entre lysine et glutamine ; (c) déamidation 36
Figure I.20 : Ratio du module de conservation d'une émulsion gélifiée sur le module de la matrice seule, en fonction de la fraction volumique en particules dispersées.....43
Figure I.21 Schémas des différentes structures formées par gélification d'un mélange de protéines et de polyoses 46

Figure I.22 : Représentation schématique du phénomène d'adsorption de protéines en surface de gouttelettes lipidiques dans un milieu aqueux, en trois étapes : diffusion de protéines d'un milieu aqueux vers une interface lipidique (A), adsorption des protéines en surface des particules lipidiques (B), stabilisation de l'émulsion (C) 49
Figure III.1 : Photos du broyeur MC15 utilisé, ainsi que de la couronne et la tête de coupe 57
Figure III.2 : Protocoles de préparation des échantillons à différentes fractions volumiques en lipides 59
Figure III.3 : Processus de lavage et étapes de séparation du culot 62
Figure III.4 : Schéma du dispositif de mesure de rhéologie par un système de type cylindre coaxial 71
Figure III.5 : Courbes types obtenues en rhéologie durant le suivi d'un processus de gélification, puis la caractérisation du gel obtenu 72
Figure IV.1 : Composition biochimique* du broyat de graines d'arachide, juste après broyage et après 4 mois de stockage à 4°C 75
Figure IV.2 : Photo du mix d'arachide préparé à 0,5 mol/L de force ionique avant et après une étape de centrifugation à 10 000 g pendant 2 h à 25°C 77
Figure IV.3 : Répartition en masse humide (A) et en masse sèche (B) des différentes fractions du mix d'arachide préparé à une force ionique de 0,5 ou 0,8 mol/L.....78
Figure IV.4: Observation microscopique du mix d'arachide préparé à 0,5 mol/L de force ionique .79
Figure IV.5 : Distribution de taille déterminée par granulométrie laser des constituants présents dans les différentes fractions d'un mix préparé à 0,5 mol/L de NaCl 80
Figure IV.6 : Observation microscopique du surnageant extrait à partir du mix d'arachide centrifugé, préparé à 0,5 mol/L. Le surnageant est dilué au 100ème et observé sous lumière blanche (A), avec un laser à fluorescence avec marquage des lipides (B), et avec utilisation du laser couplé à la lumière blanche (C) 83
Figure IV.7 : Quantification des thiols totaux (A) et de l'indice d'hydrophobicité de surface (B) des protéines extraites dans la fraction intermédiaire à 0,5 et 0,8 mol/L de force ionique. 85
Figure IV.8: A) Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines extraites à 0,5 mol/L et des protéines extraites à 0,8 mol/L. B) Mesure de l'intensité des bandes électrophorétiques SDS-PAGE par densitométrie 86
Figure IV.10 : Evolution des modules de conservation G' et de perte G'' de suspensions d'arachide au cours de différents procédés de gélification 91
Figure IV.11 : Spectre en fréquence (A) et en déformation (B) de suspensions d'arachide gélifiées par traitement thermique, enzymatique et par acidification 92

Figure IV.12 : Limite de linéarité viscoélastique (A) et Seuil d'écoulement à la déformation (B) de gels formés à partir d'une suspension aqueuse d'arachide par traitement thermique, traitement acidifiant, et traitement enzymatique 93
Figure IV.13. : Evolution des modules de conservation G' et de perte G'' de suspensions d'arachide au cours de différents procédés de gélification. (A) Traitement thermique seul et (B) prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique 96
Figure IV.14 : Propriétés rhéologiques des gels de suspensions d'arachide préparés à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L et gélifiés par traitement thermique, avec un traitement enzymatique de 3 h, et avec ce traitement enzymatique suivi du traitement thermique 98
Figure IV.15 : Gels de suspensions de graine d'arachide broyée observés en microscopie confocale, formés par traitement thermique seul (à gauche) ou par traitement enzymatique suivi d'un traitement thermique, à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L.....99
Figure V.1: SDS-PAGE patterns of the proteins extracted at 0.5M and 0.8M 111
Figure V.2: Evolution of the storage and loss moduli during gelation, for proteins extracted (and gelled) at ionic strength 0.5 M and 0.8 M 112
Figure V.3: Impact of protein concentration on the gelation time, for suspensions submitted to a thermal treatment only or to the same thermal treatment preceded by an enzymatic pretreatment.115
Figure V.4: Storage modulus as a function of the protein concentration for gels obtained by thermal treatment and by the same thermal-treatment preceded by an enzymatic pretreatment 117
Figure V.5: Images of peanut protein gels obtained by CSLM 119
Figure V.6 : Effet de la concentration en protéines sur la conductivité électrique sur de différents échantillons.....122
Figure V.7: Comparaison des gels thermiques formés à partir de la fraction intermédiaire et des gels formés à partir de protéines lyophilisées et resuspendues.....123
Figure V.9: Evolution de la taille (A) et de la fraction massique (B) des objets présents dans la fraction intermédiaire extraite à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L de force ionique au cours du traitement enzymatique 124
Figure VI.1 : Evolution du module G' et G''au cours de la gélification de la fraction intermédiaire A) délipidée, ou contenant B) 7 % (v/v), C) 25 % (v/v) et D) 40 % (v/v) de lipides.....131
Figure VI.2 : Renforcement des gels par une phase dispersée.....136
Figure VI.3: Observation en microscopie confocale de suspensions de protéines d'arachide extraites et gélifiées par un traitement thermique seul à 0,5 mol/L et contenant ϕ=0 % ;7 % ; 25 % et 40 % de gouttelettes lipidiques.....138

Figure VI.4: Observation en microscopie confocale de suspensions de protéines d'arachide extraites et gélifiées par un prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique à 0,5 mol/L et contenant ϕ=0 % ;7 % ; 25 % et 40 % de gouttelettes lipidiques 139
Figure VI.5: Observation en microscopie confocale de suspensions de protéines d'arachide extraites et gélifiées à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L de NaCl, en présence d'une fraction volumique de lipides de 40%.....140
Figure VI.6 : Masse sèche des différents échantillons formés à partir de culots (C1) issus d'une première centrifugation du mix suspendus dans de la fraction intermédiaire (I) extraite à 0,5 mol/L ou dans une solution (de même volume que la fraction intermédiaire) de NaCl à 0,5 mol/L, et de culots lavés à deux reprises (C3) remis en suspension dans une solution de NaCl à 0,5 mol/L.....143
Figure VI.7: Evolution du module élastique G' (symboles pleins) et visqueux G'' (symboles vides) au cours de la gélification de suspension C1+I, C1+NaCl et C3+NaCl extraites et préparées à 0,5 mol/L 145
Figure VI.8: Etude des modules de conservation G' (A), des facteurs de perte tan δ (B), des limites de linéarité viscoélastique (C) et des seuils d'écoulement à la déformation (D) de gels formés à partir de culot mélangé à une fraction intermédiaire, à une solution de NaCl et de culot lavé deux fois et dispersée dans une solution de NaCl.....148
Figure VI.9: Observation en microscopie confocale de gels formés à partir de culots extraits et dispersés dans la fraction intermédiaire (A et C) et dans une solution de NaCl (B et D), à 0,5 mol/L de force ionique.....149
Figure VI.10 : Observation au microscope optique de gels obtenus à partir de culots dispersés dans une solution de NaCl à 0,5 mol/L de force ionique, gélifiés par traitement thermique (A) et par traitement enzymatique suivi d'un traitement thermique (B) 150
Figure VII.1 : Composition et propriétés d'une suspension de graines d'arachide broyées, et impact du procédé et des différentes fractions du mélange sur ses propriétés structurelles et élastiques157
Figure S1: Activité relative de la transglutaminase. A) Activité en fonction du pH ; B) Activité en fonction de la température ; C) Stabilité en fonction de la température.....184
Figure S2 : Comparaison des traitements thermiques appliqués lors d'une gélification dans le rhéomètre ou au bain-marie. Cas d'une gélification sans prétraitement enzymatique (A) et avec un prétraitement enzymatique (B).....185
Figure S3 : Schéma du dispositif de mesure de texture des gels formés au bain-marie 186
Figure S4 : Courbe type d'une mesure de texture d'un gel de suspension d'arachide. La force mesurée est représentée en fonction de la distance de pénétration de la sonde dans le gel.....187

Figure S5 : Force de gel (mesurée par pénétrométrie), pour des gels produits à partir du mix par traitement thermique ou un traitement thermique précédé d'un traitement enzymatique.....188
Figure S6 : Module élastique (déterminés à faible déformation, en rhéomètre) en fonction de la force de gel (mesurée par pénétrométrie), pour des gels produits par traitement thermique ou un traitement thermique précédé d'un traitement enzymatique 189
Figure S7 : Observation en microscopie confocale de suspensions de protéines d'arachide extraites à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L et contenant ϕ=0% ;7% ; 25% et 40% de gouttelettes lipidiques 191

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Composition en macronutriments de légumineuses et de fruits à coque, données issues des tables CIQUAL 5
Tableau I.2 : Description des différentes variétés d'arachide (Arachis hypogaea L.) cultivées dans le monde 6
Tableau I.3 : Gélification de protéines d'arachide sous différentes formes par procédé thermique, acidification et traitement enzymatique par la mTG et propriétés mécaniques des gels formés 38
Tableau IV.1 : Composition biochimique du mix d'arachide préparé par mélange du broyat dans une solution saline à 0,5 et à 0,8 mol/L de force ionique 77
Tableau IV.2 : Répartition en masse humide et sèche des différents constituants du mix dans les trois fractions séparées à 0,5 mol/L de NaCl et à 0,8 mol/L 81
Tableau IV.3 : Observation au microscope optique à fluorescence des sous-fractions du culot (C1 à C4) extraites à 0,5 mol/L de NaCl, à 10 000 g pendant 2 heures.....88
Tableau IV.4 : Propriétés viscoélastiques des gels après 17 heures de gélification par traitement thermique, enzymatique ou acidifiant 91
Tableau IV.5 : Propriétés rhéologiques de gels thermiques de mix formés à 0,5 mol/L de NaCl à différentes vitesses de montée et descente en température 94
Figure IV.13. : Evolution des modules de conservation G' et de perte G'' de suspensions d'arachide au cours de différents procédés de gélification. (A) Traitement thermique seul et (B) prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique. 96
Tableau IV.6 : Valeur, température et temps de la vitesse maximale de structuration des gels de suspension de graines d'arachides broyées gélifiées à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L par traitement thermique et par prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique 97
Table V.1: Classification and protein concentration range (Cp, in g/100g) of the different samples 109
Tableau VI.1: Valeur, température et temps d'apparition de la vitesse maximale de structuration des gels formés à différentes fractions volumiques en lipides, par un traitement thermique seul et par un prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique, à 0,5 mol/L et 0,8 mol/L. 132
Tableau VI.2 : Impact de la fraction volumique en gouttelettes lipidiques sur les propriétés rhéologiques de gels de protéines d'arachide formés par prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique 134

Tableau VI.3: Impact de la fraction volumique en gouttelettes lipidiques sur les propriétés rhéologiques de gels de protéines d'arachide formés par traitement thermique 134
Tableau VI.4 : Concentration massique de protéines solubles (quantifiées dans la phase aqueuse), insolubles (quantifiées dans le culot) et totales et quantité en pourcent de la matière sèche.....144
Figure VI.7: Evolution du module élastique G' et visqueux G'' au cours de la gélification de suspension C1+I, C1+NaCl et C3+NaCl extraites et préparées à 0,5 mol/L 145
Tableau VI.5: Valeur, température et temps d'apparition de la vitesse maximale de structuration des gels formés à 0,5 mol/L de force ionique à partir de culot mélangés à une fraction intermédiaire, à une solution de NaCl et de culot lavé deux fois par des solutions de NaCl et dispersée dans la deuxième solution de lavage 146
Tableau S1 : Durée pour l'inactivation thermique de la transglutaminase 184

Introduction générale

Les sociétés de nombreux pays d'Afrique et d'Asie souffrent encore aujourd'hui de divers troubles liés à l'alimentation de leurs populations : sous-nutrition, carences alimentaires, malnutrition. Ces troubles peuvent être à l'origine d'un retard de développement chez l'enfant ou de maladies chez l'enfant comme chez l'adulte (diabète, anémie, cécité, etc.). Ces populations sont le plus souvent dépendantes de produits importés coûteux pour un accès à une alimentation de qualité. Il est donc essentiel de permettre à ces pays d'accéder à une autonomie nutritionnelle en développant avec des acteurs locaux de l'industrie agroalimentaire des produits sains à partir de matières premières produites localement et dont la transformation serait peu coûteuse, ceci afin de créer des produits accessibles pour les populations les plus démunies et donc les plus fragiles. L'arachide apparaît alors comme une matière première particulièrement intéressante. En effet, elle est produite dans de nombreux pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud où elle est ancrée dans les mœurs alimentaires et consommée localement crue, ou en assaisonnement dans des sauces (Nautiyal, 2002; Revoredo and Fletcher, 2002). La Chine et l'Inde en sont aujourd'hui les principaux producteurs (60% de la production mondiale). Cette prolifération géographique est à l'origine d'une grande diversité variétale (Moretzsohn et al., 2004). Entre les années 1970 et 2000, une diminution de la production d'arachide (-5% du volume produit) a été observé en Europe et aux Etats-Unis, où l'arachide est principalement consommée sur place, et une augmentation de la production et de l'export en Asie et en Afrique (de +20 à +350 % de volume produit selon la région) a été constatée. Dans le monde, cela se traduit par une augmentation de 28% du volume d'arachide importé (+320 000 tonnes), principalement vers l'Europe depuis l'Asie (Revoredo and Fletcher, 2002). Entre 2000 et 2017, cette tendance s'est poursuivie avec une augmentation du volume d'arachide importée de 80%, toujours principalement par l'Europe depuis l'Asie. L'Inde est le premier exportateur avec 32% des exportations mondiales, suivi par les Etats-Unis avec 16% des exportations mondiales (FAO, 2017).

Les bienfaits santé reconnus de l'arachide sont aujourd'hui nombreux. Il a été démontré que la consommation fréquente de cette graine apportait au régime alimentaire une source de vitamines A et E, de folates, magnésium, zinc, fer, calcium, phosphore et fibres suffisante pour satisfaire les recommandations nutritionnelles de référence, sans engendrer de prise de poids (Griel et al., 2004). En effet, l'arachide présente un indice glycémique faible (14) et sa teneur élevée en lipides est compensée par un fort effet satiétogène (Higgs, 2003). Les acides gras constitutifs de l'arachide sont à 75 % des acides gras insaturés, dont 50 % d'acide oléique (mono-insaturé). La consommation d'arachide et de produits à base d'arachide (huile, beurre) a été associée à une réduction du cholestérol total de 11 % et du cholestérol LDL (Low-Density Lipoprotein) de 14 % après 10 semaines de consommation modérée (38 g/jour) d'arachide (Pelkman et al., 2004). Cela conduirait selon plusieurs

études à une diminution du risque de maladies coronariennes et cardiaques, avec une diminution de 24 % lors d'une consommation bihebdomadaire d'arachide, et une diminution de plus de 37 % lorsqu'elle est consommée plus de quatre fois par semaine (Bao, 2014; Francisco and Resurreccion, 2008; Fraser et al., 1992; Kelly and Sabaté, 2006).

L'une des missions que s'est donnée l'entreprise Onyx Développement est de développer de nouveaux itinéraires technologiques permettant de valoriser des matières premières végétales pour préparer des aliments de qualité à destination des consommateurs des pays du sud. L'ambition est d'apporter des solutions pour améliorer la satisfaction alimentaire des populations des pays en voie de développement. La satisfaction alimentaire, dans son sens le plus usuel, peut s'entendre d'un point de vue quantitatif et nutritionnel. Cependant, dans un sens plus élargi faisant notamment appel aux sciences sociales, la satisfaction alimentaire est multifonctionnelle. Elle relève de la fonction physiologique (nutrition), mais aussi des fonctions sociales, identitaires et sensorielles, ce qui intègre les notions de texture, goût, odeur et couleur (Héron, 2017).

Les aliments développés par l'entreprise ont vocation à être produits et commercialisés dans les pays du sud, par des entreprises locales. Ils doivent correspondre aux systèmes alimentaires des marchés auxquels ils sont destinés (populations urbaines), et pour cela répondre à de grands enjeux socio-économiques et technologiques : cycle court, coût et qualité des matières premières, conditions de transformation et de conservation, acceptabilité sociale et hédonique. Les recherches portent sur la mise en œuvre de mélanges devant se conserver plusieurs mois à température ambiante (c'est-à-dire, 30-40°C dans les pays du sud), pour pouvoir utiliser des circuits de distribution traditionnels qui ne sont pas prévus pour maintenir la chaîne du froid. La création de nouvelles matrices alimentaires fait largement appel à l'ingénierie des polymères par voie enzymatique, chimique et physique et exclut de façon définitive les additifs dits de synthèse. Le procédé de préparation doit être suffisamment performant pour être transférable en Afrique dans un atelier de préparation simple et respectueux de l'environnement.

L'un des objectifs de l'entreprise est de développer de nouvelles matrices alimentaires à base de graines d'arachide entières broyées puis gélifiées. Le broyage de l'arachide en phase aqueuse conduit à la formation d'un mélange relativement pâteux, couramment appelé mix au sein de l'entreprise. Des travaux réalisés précédemment ont montré que ce mix pouvait former un solide en présence d'une enzyme, la transglutaminase (procédé breveté par l'entreprise). L'hypothèse avancée est qu'au cours du broyage de la graine en phase aqueuse, une partie des protéines de l'arachide serait solubilisée dans la phase aqueuse, puis que l'action enzymatique permettrait la prise en gel de cette solution de protéines, emprisonnant les autres composants de la graine restés insolubles. Le pilotage fin des

paramètres du procédé, permettant de maîtriser les propriétés du gel obtenu, se heurte cependant à une connaissance limitée de la composition et de la structure du produit, et des mécanismes de gélification conduisant à la prise en masse du mix. Ce travail de thèse s'inscrit donc dans cet objectif de meilleure compréhension des phénomènes associés à la gélification du mix.

Le manuscrit est structuré en six chapitres.

Le premier chapitre présente un état de l'art des connaissances sur la composition et la structure de la graine d'arachide, sur les procédés d'extraction des protéines et sur les propriétés fonctionnelles de ces dernières.
Le second chapitre présente la stratégie expérimentale mise en place.
Le troisième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées au cours de cette recherche.
Le quatrième chapitre est consacré à la caractérisation de l'arachide utilisée et de la capacité des mix, simplement obtenus par broyage en phase aqueuse, à former une structure gélifiée. Nous avons caractérisé la composition biochimique ainsi que la structure des mix obtenus, puis nous avons étudié leur capacité à former un gel suivant différents procédés identifiés dans l'étude bibliographique. Nous avons ainsi pu sélectionner un procédé permettant d'obtenir des gels stables et caractérisé ces gels.
Le cinquième chapitre se focalise sur la gélification des protéines de l'arachide. Pour étudier plus finement ces mécanismes, des protéines ont été extraites de façon à pouvoir étudier l'effet de différents paramètres opératoires sur leurs processus de gélification et sur les propriétés mécaniques des gels obtenus, indépendamment des autres constituants du mix. Ce chapitre est composé d'un article publié dans *Food Research International*, ainsi que de résultats complémentaires obtenus par la suite.
Le sixième chapitre présente ensuite l'impact de la dispersion des corps lipidiques et des éléments insolubles contenus dans la graine sur la gélification du mix. Nous avons successivement dispersé la fraction lipidique puis les éléments insolubles de la graine dans des solutions de protéines, et nous avons étudié l'impact de chacun des ajouts sur les propriétés des gels obtenus.
Enfin, le manuscrit s'achève avec une conclusion générale qui reprend les discussions présentées au fur et à mesure du manuscrit, identifie des leviers pour piloter les propriétés physiques et structurales, et ouvre vers de nouvelles questions de recherche.

Chapitre I :

Etude bibliographique

I.1 Description, organisation et composition de la graine d'arachide

I.1.1 Description de la graine d'arachide

L'arachide domestique (*Arachis hypogaea* L.) est une légumineuse originaire d'Argentine. Elle appartient à la sous-famille des Papilionacées et accumule ainsi dans ses cotylédons ses réserves nutritives principalement constituées de protéines, de grains d'amidon et de lipides (Chevalier, 1933). Malgré cette appartenance taxonomique à la famille des légumineuses, et à l'instar de sa similarité visuelle, l'arachide présente une composition en macronutriments plus proche de celle des fruits à coques (tableau I.1). En effet, bien que riche en protéines comme la plupart des légumineuses, l'arachide est également riche en lipides et pauvre en sucres comme la plupart des fruits à coques (ANSES, 2017) . Dans le tableau I.1, les concentrations massiques sont indiquées pour 100g de matière fraîche (ou humide), la teneur en eau de la graine fraîche étant généralement de 4 g/100g. Les concentrations peuvent cependant aussi parfois être données pour 100 g de matière sèche (après évaporation de l'eau). De façon générale, et sauf indications contraire, les compositions massiques données sont exprimées par rapport à la matière fraîche.

Tableau I.1 : Composition en macronutriments de légumineuses et de fruits à coque, données issues des tables CIQUAL, en g/100g de matière fraîche. (ANSES, 2017)

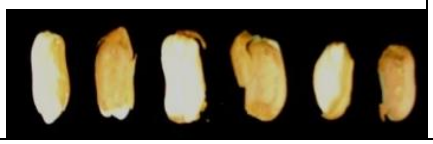
		Protéines*	**Lipides**	**Glucides**
Légumineuses	**Arachide**	**26**	**49**	**15**
	Lentille corail	28	1	45
	Lupin	36	10	22
	Pois chiche	23	1	48
	Soja	38	19	21
Fruits à coques	**Amande**	25	53	8
	Noix	16	67	7
	Noix de cajou	18	50	27
	Noix du brésil	17	67	5
	Pistache	22	47	19

**Facteur de Kjeldahl Nx6,25*

Alors que l'Asie et l'Afrique multiplient les variétés d'arachide, l'Amérique suit la classification proposée par les Etats-Unis et classe sa production d'arachide en quatre variétés principales: Spanish, Runner, Valencia et Virginia (tableau I.2). La Runner, créée par hybridation en 1969, correspond aujourd'hui à plus de 90 % du volume de production aux Etats-Unis (Bilello, 2016; CRB, 2007). 50 % de la production mondiale d'arachide servent à la confection de beurre de cacahuètes, produit par grillage et broyage de l'arachide blanchie (Bilello, 2016; Chun, 2002; CRB, 2007).

Cette diversité se traduit par une variabilité dans la composition nutritionnelle des différents cultivars, notamment dans les profils en acides aminés et acides gras comme nous le verrons dans le § I.1.3.

Tableau I.2 : Description des différentes variétés d'arachide (Arachis hypogaea L.) cultivées dans le monde (Kottapalli et al., 2008; Stalker, 1997; Stalker and Wilson, 2016)

	Image (Kottapalli et al., 2008)	**Taille** (et masse) **des graines**	**Nombre de cotylédons par cosse**	**Couleur**	**Utilisation**	
					Directe	Produit transformé
Spanish (*fastigiata vulgaris*)		Moyenne (550-650 mg)	2	Brune	Snacks (crues ou bouillies)	Beurre de cacahuète
Runner (Hybride Spanish-Virginia)		Moyenne (550-650 mg)	2	Rouge	Snacks (grillée)	Friandise, beurre de cacahuète
Valencia (*fastigiata fastigiata*)		Petite	3 ou 4	Rouge-brune	Grillées dans la cosse, bouillies	Beurre de cacahuète
Virginia (*hypogaea hypogaea*)		Large cosse, grosses graines	2	Brune	Snacks, grillées dans la cosse	

I.1.2 Organisation d'une graine d'arachide

L'arachide, une fois récoltée, est composée de trois parties distinctes (figure I.1) :

- la cosse, non comestible
- une pellicule rouge-brune qui protège les cotylédons
- les cotylédons (deux à quatre selon la variété)

Ce sont ces cotylédons qui composent la partie comestible de l'arachide et c'est à eux que l'on fait référence lorsqu'on utilise le terme de « graine ». La graine correspond à 96 % de la masse de l'arachide et est de forme ovale. Elle est facilement séparable en deux cotylédons (pour les variétés Spanish, Runner et Virginia, 3 ou 4 pour la variété Valencia), avec une indentation sur leur face interne (Young and Schadel, 1990a).



Figure I.1 : Arachide présentée dans et hors de sa cosse, enveloppée de sa pellicule et dépelliculée. Image libre de droit

I.1.2.1 Organisation générale

La graine d'arachide est composée de tissus épidermiques, vasculaires et parenchymateux. Le tissu épidermique est situé à la surface de la graine et se compose d'une unique couche de cellules. Ce tissu est principalement composé de cellules de garde, produites par paire avec un stomate entre deux cellules afin de permettre les échanges entre la graine et le milieu extérieur (Young and Schadel, 1990b). Le tissu vasculaire s'organise en deux couches : une couche mince située sous le tissu épidermique, et une couche qui part du centre des cotylédons et se propage en faisceaux dans l'ensemble de la graine. Enfin, le tissu parenchymateux constitue le principal tissu de la graine d'arachide. Il se compose de cellules larges (environ 120 µm de diamètre) et contient les réserves énergétiques de la graine (Young and Schadel, 1984). Ces réserves sont contenues dans diverses corpuscules subcellulaires tels que les grains d'amidon, les sphérosomes (stockage des lipides) et les aleurones (stockage des protéines), lesquels sont susceptibles de contenir des globoïdes (Dieckert et al., 1962; Zaaboul et al., 2018). Une coupe transversale de cotylédon est présentée en figure I.2

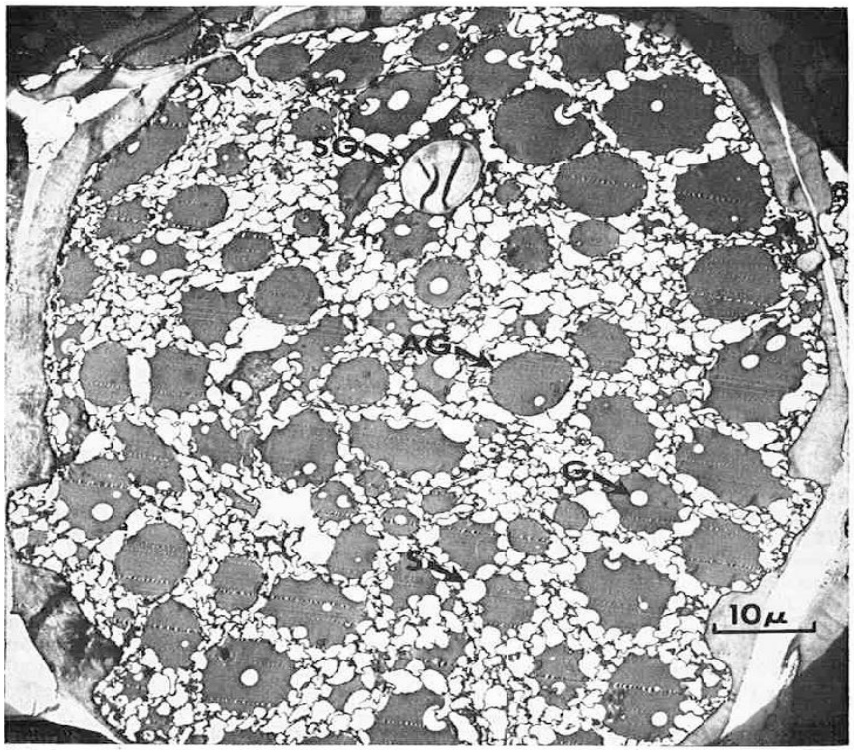


Figure I.2 : Micrographie électronique d'une coupe transversale de cellule du parenchyme de cotylédon d'arachide. SG: Grains d'amidon; AG: Aleurone; G: Globoïde; S: Sphérosome. (Source:Angelo and Mann, 1973)

I.1.2.2 Grains d'amidon

Les grains d'amidon se développent dans les amyloplastes des cellules parenchymateuses lors de la maturation de la plante. Ils peuvent être isolés ou agrégés lorsque plusieurs grains se forment dans un même amyloplaste (Young et al., 2006). Ce sont des grains sphériques de diamètre compris entre 5 et 15 µm (Angelo and Mann, 1973). Ils se distinguent des autres corpuscules sphériques (aleurones et sphérosomes) par un hilum central, ainsi que par des propriétés optiques de biréfringence qui permettent de les observer sous une lumière polarisée. Ils présentent alors le motif de croix de malte caractéristique des grains d'amidon.

I.1.2.3 Sphérosomes

Les sphérosomes, aussi appelés oléosomes, sont des particules sphériques de 1 à 2 µm. Ces particules constituent les réserves en lipides de la graine d'arachide (Nikiforidis, 2019; Young and Schadel, 1991). Elles se développent tout d'abord sous la forme de vésicules issues du réticulum endoplasmique. Le réticulum synthétise les triglycérides par voie enzymatique, et le stockage de ces

triglycérides hydrophobes entre les deux couches de la double membrane de phospholipides va engendrer la formation d'un bourgeon en surface du réticulum. Les oléosines synthétisées *via* les polyribosomes liés au réticulum vont alors stabiliser la vésicule, ce qui va libérer un sphérosome mature entouré par une membrane monocouche (Huang, 1996). Cette membrane de 2-3 nm d'épaisseur protège les triglycérides du stress oxydatif, thermique et hydrique et correspond à environ 2 g/100 g de sphérosome. (Yatsu and Jacks, 1972). Elle est composée de phospholipides (0,77 g/100 g de sphérosome) et de protéines (1,27 g/100 g de sphérosome) telles que les oléosines, les caléosines et les stéléosines (Jacks et al., 1967; Yatsu and Jacks, 1972; Zaaboul et al., 2018). En plus des triglycérides, les sphérosomes stockent également les lipides sous forme de phytostérols (β-sitosterol, campesterol et stigmasterol en particulier) et de tocophérols (principalement α- et δ-tocophérols) (Zaaboul et al., 2018). Ces organelles composent une fraction aisément extractible et observable. En effet, les sphérosomes ont une densité inférieure à 1 et surnagent donc lors d'une extraction liquide-liquide dans de l'eau. De plus, ils sont discernables en microscopie optique et peuvent être marqués par des marqueurs des lipides tels que le Soudan III, le Bleu de Nil ou la rhodanine B, mais également par du vert Janus (colorant cationique), indiquant le caractère anionique des phospholipides composant la membrane (Frey-Wyssling et al., 1963; Tzen et al., 1992; Vaca Medina, 2010).

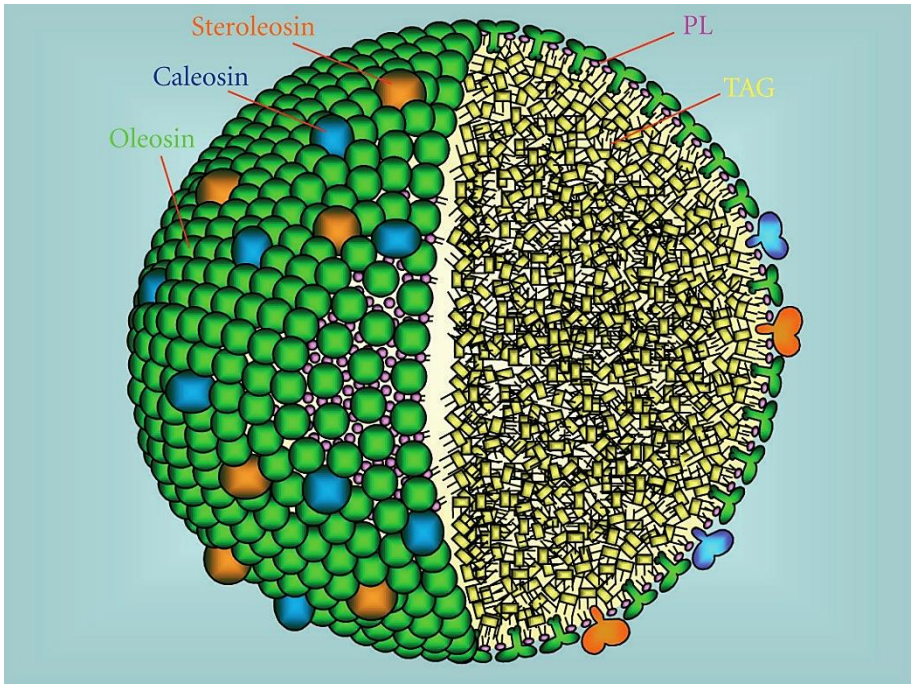


Figure I.3 : Schéma d'une coupe de sphérosome, d'après le modèle de (Tzen, 2012). Le diamètre a été réduit pour une meilleure observation des éléments à la surface. TAG : Triglycéride, PL : Phospholipide

I.1.2.4 Aleurones

Les aleurones sont les structures permettant le stockage des protéines de réserve de la graine. Elles se situent également dans les cellules parenchymateuses des cotylédons de l'arachide. Ce sont des globules de diamètre compris entre 3 et 10 µm (Young and Schadel, 1991), qui proviennent de la déshydratation de vacuoles cellulaires (une vacuole donne un aleurone) lors de la croissance de la plante. Leur membrane est donc une membrane lipidique semi-perméable composée de lipides neutres et de phospholipides. Lors de la croissance de la plante, la vacuole se remplit de protéines de réserve, stockées sous la forme d'une phase protéique amorphe au sein de l'aleurone (Amonsou et al., 2011; Bethke et al., 1996). Un aleurone d'arachide peut parfois contenir une ou plusieurs inclusion(s) cristalline(s) sphérique(s) appelées globoïde(s), riche(s) en phytine (Chevalier, 1934). Ces inclusions mesurent entre 0,5 et 4 µm et sont principalement constituées de protéines (35 g/100g) et de phosphore sous forme d'acide phytique et de phytine (28g/100g), ainsi que d'eau (9 g/100g), de magnésium (2,5 g/100g), de potassium (2 g/100g) et de calcium (0,5 g/100g) (Sharma and Dieckert, 1975). Les protéines contenues dans les globoïdes ne dépassent pas 1 g/100 g des protéines totales d'une aleurone, elles n'ont pas été identifiées à notre connaissance. Leur nombre et leur taille varient d'un grain d'aleurone à un autre, ce qui induit une variabilité dans leur composition biochimique. C'est au sein des aleurones que se trouvent les réserves de phosphore de l'arachide, principalement stockées sous forme d'acide phytique et à un degré moindre de phytine. La structure de ces aleurones est particulièrement sensible aux solutions aqueuses et salines, qui ont pour effet de déstabiliser leur membrane par différence de pression osmotique (Mikola et al., 1975).

I.1.3 Composition biochimique de la graine d'arachide

I.1.3.1 Profil en acide gras de la graine d'arachide

Les lipides sont les principaux constituants de la graine d'arachide. La teneur en lipides de la graine varie entre 44 et 56 g/100 g, en masse fraîche (Toomer, 2017). Il s'agit principalement de triglycérides (~97 g /100 g de lipides), le reste est composé de phospholipides (réparti environ en 50 % de phosphatidylcholine, 25 % de phosphatidyléthanolamine et 25 % de phosphatidylsérine, en masse) (Yoshida et al., 2005) et de stérols (réparti environ en 75 % de β-sitostérols, 13 % de campestérols et 12 % de stigmastérols, en masse) (Sheppard and Rudolf, 1991).

Le profil en acides gras diffère selon la variété d'arachide considérée (figure I.4), mais également en fonction des conditions géographiques et climatiques de sa production. Les données présentées ici sont donc à considérer comme des valeurs indicatives, susceptibles de varier selon ces différents facteurs.

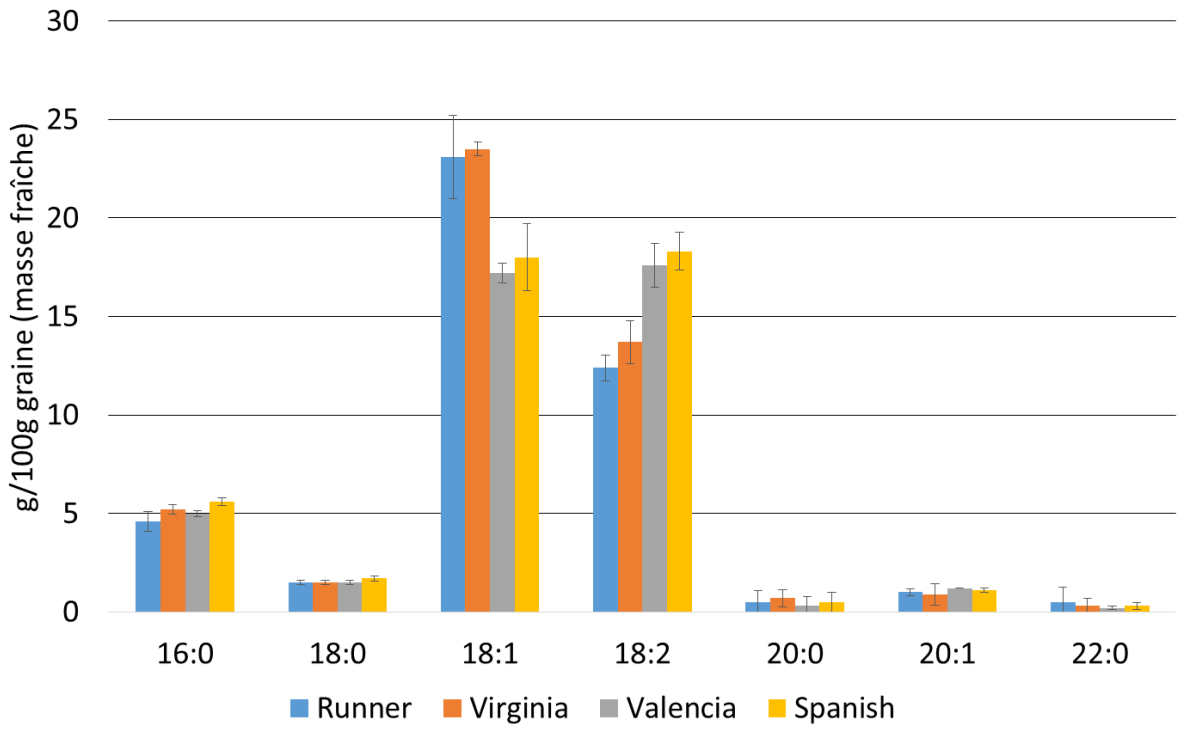


Figure I.4 : Profil en acides gras de différentes variétés d'arachide. D'après Andersen et al., 1998

On constate que l'acide oléique (C18 :1) et l'acide linoléique (C18 :2) sont les deux acides gras majoritaires de l'arachide. Le ratio entre ces deux composés (C18 :1/C18 :2) varie d'une variété à l'autre : 1 pour les variétés Spanish et Valencia, 1,7 pour la variété Virginia et 1,9 pour la variété Runner. Il est démontré que ce ratio est directement corrélé à une meilleure stabilité à l'oxydation des lipides et permet ainsi de conduire à des produits avec une durée de conservation plus élevée (Brown et al., 1975). C'est pour leur ratio C18 :1/C18 :2 naturellement élevé que des cultivars ont été génétiquement sélectionnés pour produire des arachides dites à haute teneur en acide oléique (HO, pour « High Oleic ») : environ 38 g/100 g en acide oléique et 2 g/100 g en acide linoléique.

I.1.3.2 Profil glucidique de la graine d'arachide

Comme indiqué dans le tableau I.1, la graine d'arachide est composée en moyenne de 15 g/100 g de glucides (Liu et al., 2016; USDA, 2016). Cette valeur peut atteindre jusqu'à 27 g/100 g dans certains cultivars en fonction des conditions de culture (Asibuo et al., 2008).

Il est cependant important de noter que les teneurs en glucides des graines d'arachide sont le plus souvent mesurées par différence (soustraction à la masse totale d'un échantillon des teneurs en eau, protéines, lipides et cendres), ce qui suppose de les considérer avec précaution (Stalker and Wilson, 2016). Les polyosides sont, en masse, les principaux glucides de l'arachide : ils constituent 65 % des glucides totaux (figure I.5). Il s'agit notamment d'hétéropolysaccharides, de l'amidon et des fibres contenus dans la graine. Les oligosides constituent 34 % en masse des glucides totaux. Le principal oligoside est le saccharose (30 % des sucres totaux), qu'on retrouve en quantité équivalente dans toutes les variétés, à l'exception de la variété Virginia qui est 1,2 fois plus riche en saccharose que les autres. Les principaux oses simples des graines d'arachide sont le fructose et le glucose, ils constituent chacun 0,5 % en masse des glucides totaux (Liu et al., 2016). Les variétés Spanish et Valencia sont particulièrement riches en oses simples et possèdent respectivement 4,0 et 2,5 fois plus de glucose et de fructose que les variétés Runner et Virginia (Pattee et al., 2000). Pattee et.al (2000) ont étudié l'effet de la localisation géographique sur la composition en glucides au sein d'une même variété. Ils ont constaté des variations de 5 % au maximum (en masse de glucides totaux) sur 52 échantillons issus de 2 états américains différents (Pattee et al., 2000).

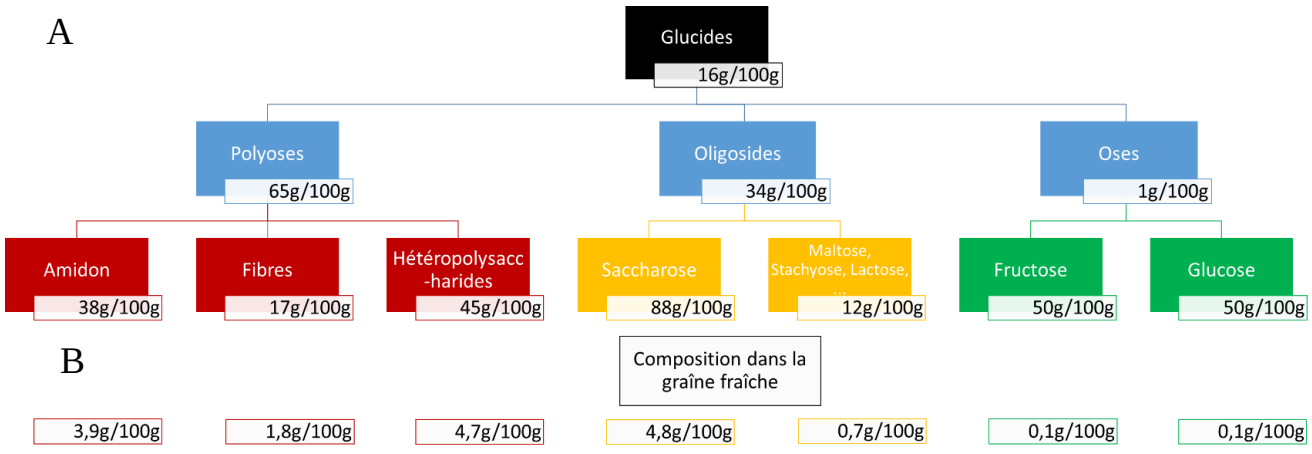


Figure I.5 : Composition de la graine d'arachide en glucides. Les valeurs sont exprimées en g/100g de la catégorie supérieure (A) et en g/100g de graine fraîche (B), en masse humide. Adapté de Liu et al., 2016

I.1.3.3 Profil protéique de la graine d'arachide

La graine d'arachide est composée d'environ 24 g/100 g de protéines totales (N*5,46) en masse fraîche (Misra, 2001), dont 2 à 10 % de conglutines solubles dans l'eau (albumines, protéines de transfert de lipides) et 75 à 90 % de globulines, solubles dans des solutions salines. Le reste est composé de protéines de régulation des filaments d'actine, constituant principal du cytosquelette (profilines), de protéines de défense (défensines) et de protéines constitutives de la paroi des corps lipidiques de l'arachide (oléosines, stéroléosines, caléosines) (Bublin and Breiteneder, 2014; Toomer, 2017; Zaaboul et al., 2018; Zhuang and Dreskin, 2013). Les globulines de l'arachide peuvent être classées en deux familles: les arachines (66g/100g de protéines totales) et les conarachines (30g/100g), elles-mêmes réparties en deux sous-familles, les conarachines I (13g/100g de protéines totales) et les conarachines II (17g/100g). L'arachine est un hexamère (360-380 kDa) constitué de deux trimères, l'un composé de sous-unités basiques et l'autre de sous-unités acides. La conarachine I est un trimère composé de polypeptides de faibles poids moléculaires (18 kDa, 17 kDa et 15,5 kDa), tandis que la conarachine II est un trimère composé de sous-unités de poids moléculaires 64 kDa (Hu et al., 2011; Johns and Jones, 1917; Koppelman et al., 2001; Monteiro and Prakash, 1994; Toomer, 2017; Wang, 2016). On note également des différences de composition en acides aminés, notamment, les conarachines contiennent 2,3 fois plus d'acides aminés soufrés que l'arachine, et la conarachine I et la conarachine II contiennent respectivement 2,3 fois et 1,8 fois plus de lysine, et 3 fois plus de glutamine que l'arachine (Brown, 1942; Cabanos et al., 2011; Ghatak and Sen, 2013; Jin et al., 2009). Les protéines en surface des sphérosomes contiennent, elles, 1,8 fois plus de lysine et 3 fois plus de cystéine qu'un isolat de protéines d'arachide disponible dans le commerce (Zaaboul et al., 2018).

La composition des protéines d'arachides en acides aminés essentiels se distingue par une richesse en leucine et phénylalanine. Leur teneur en lysine est plus faible que celle des protéines animales (<1 g/100 g de protéines, soit inférieure à la protéine de référence basée sur les besoins en acides aminés essentiels de l'Homme), et néanmoins plus riche que plusieurs sources céréalières (1,3 fois plus que le blé et 1,6 fois plus que le sorgho, par exemple). Elles sont également particulièrement riches en certains acides aminés non indispensables tels que l'arginine, l'acide glutamique et l'acide aspartique (figure I.6). L'arachide est également riche en acides aminés soufrés (méthionine, cystéine). Or ces acides aminés ont un rôle un important dans les procédés de gélification thermique, tels que nous le verrons plus tard (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2007; Young and Pellett, 1994). A cette composition intéressante s'ajoute une digestibilité des protéines d'arachide de 95 %, soit l'équivalent de celle de protéines animales et 20 % plus élevée que celles de l'avoine, du blé, du

riz et du maïs (WHO, 2007). Cette qualité peut également être objectivée par l'indice chimique corrigé de la digestibilité, encore appelé Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PD-CAAS) en anglais, qui est calculé en multipliant la digestibilité réelle de la protéine par son indice chimique, c'est à dire le ratio de l'apport du premier acide aminé limitant dans la protéine du produit concerné sur la teneur en ce même acide aminé dans la protéine de référence (ANSES, 2016). Le PD-CAAS calculé pour l'arachide est 0,7 contre 0,46 et 0,43 pour le blé et le maïs, respectivement (Arya et al., 2016).

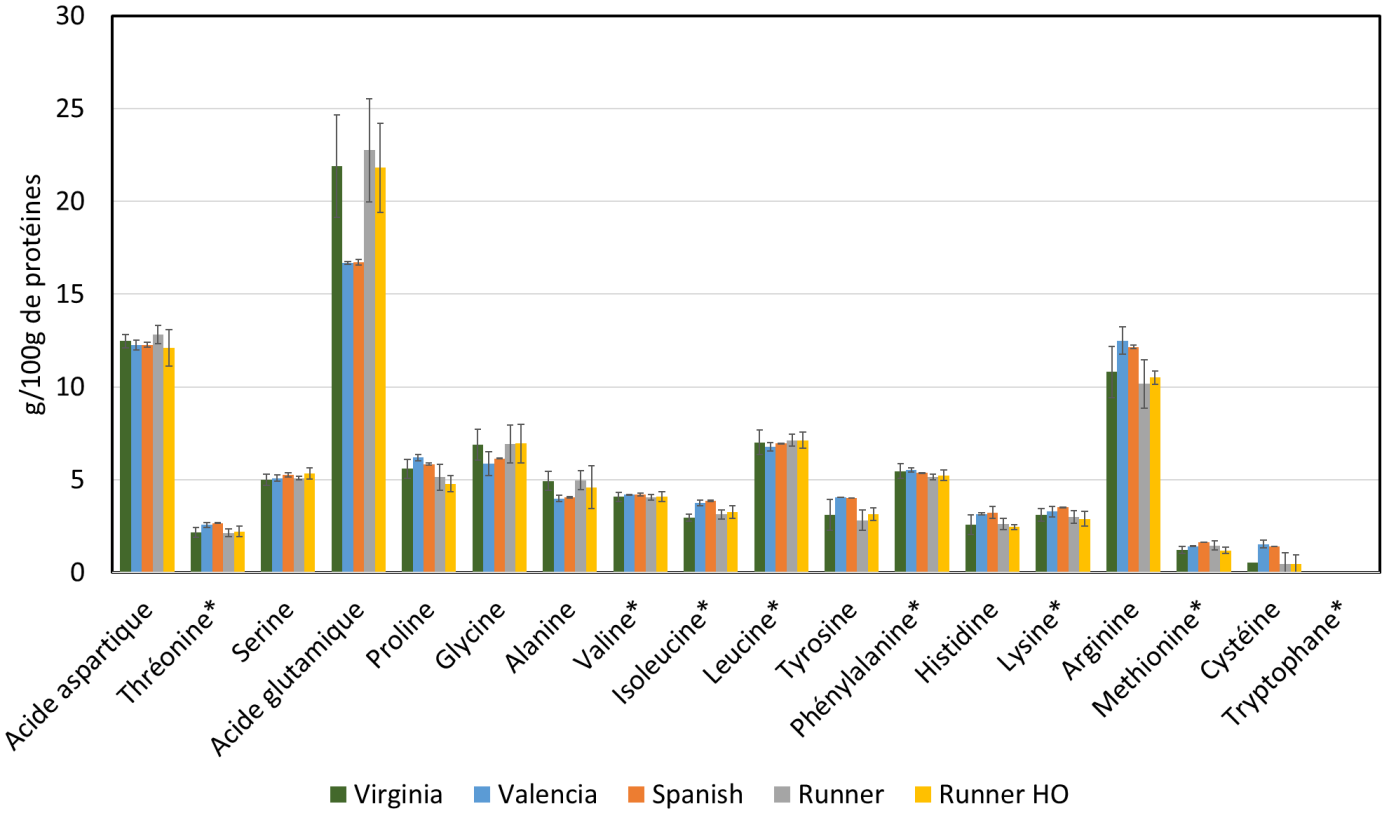


*Figure I.6 : Composition en acides aminés des différentes variétés d'arachide. * : acides aminés indispensables. HO : High Oleic (teneur élevée en acide oléique). Donnée manquante pour le tryptophane. Source : (Andersen et al., 1998; Hovis et al., 1982)*

I.1.3.4 Micro-constituants des graines d'arachide

La graine d'arachide est également riche en micro-constituants tels que le magnésium, la vitamine D et la vitamine B3 (figure I.7 et I.8), dont les teneurs sont supérieures à celles d'autres légumineuses comme le soja (pour les vitamines D et B3), le pois chiche (pour la vitamine B3 et le magnésium) et la lentille corail (pour les vitamines D et B3, et pour le magnésium).

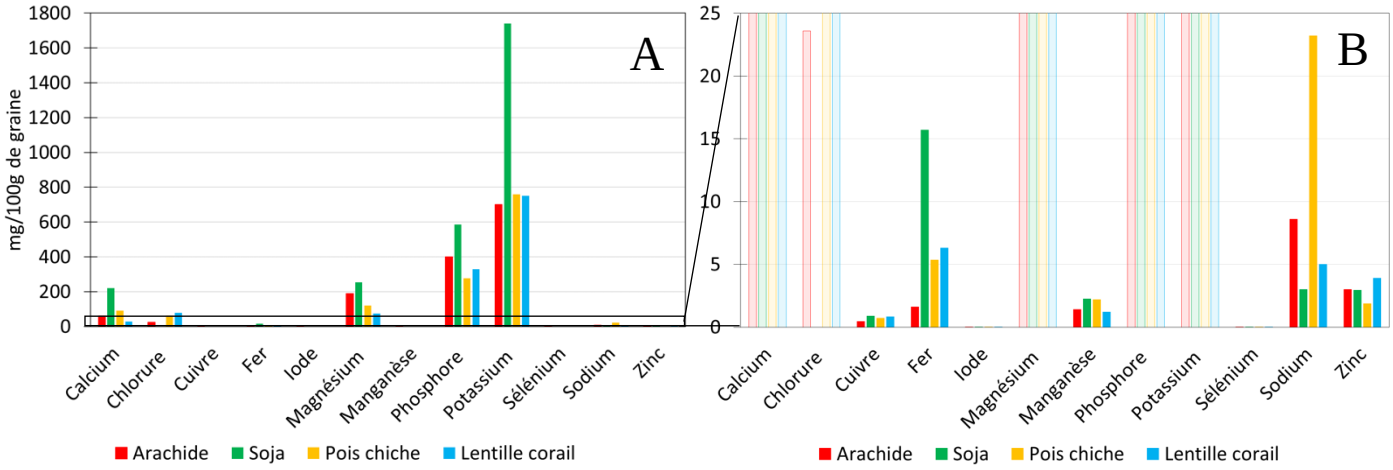


Figure I.7 : Composition en minéraux de la graine d'arachide et d'autres légumineuses. Les valeurs sont présentées pour 100g de graine fraîche. La composition est présentée dans son intégralité (A) et un zoom est présenté pour les éléments ≤25mg/100g de graine fraîche (B)

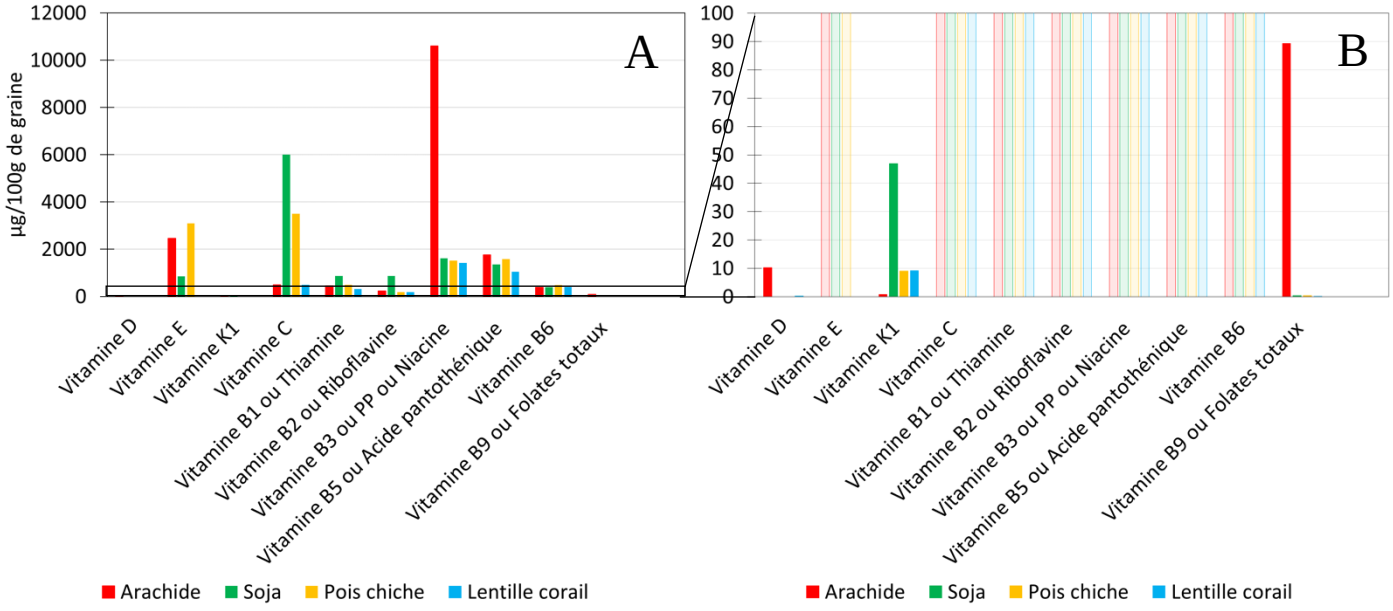


Figure I.8 : Composition en vitamines de la graine d'arachide et d'autres légumineuses. Les valeurs sont présentées pour 100g de graine fraîche. La composition est présentée dans son intégralité (A) et un zoom est présenté pour les éléments ≤100 µg/100g de graine fraîche (B)

L'arachide est également intéressante pour ses teneurs en iode et sélénium, oligo-éléments importants notamment pour leur rôle dans la régulation des hormones thyroïdiennes. Elles sont proches de celle de la lentille corail, et trois à quinze fois supérieures à celles du soja et du pois chiche (Triggiani et al., 2009).

Si l'on rapporte ces teneurs en micronutriments, pour 100g d'arachide, aux références nutritionnelles journalières en vigueur aux Etats-Unis (*Arrêté du 3 décembre 1993*, 1993; USDA, 2016), on constate que la composition en cuivre, manganèse, vitamine B3 et vitamine B9 est particulièrement intéressante puisque la consommation de 100g d'arachide permet de couvrir plus de 60 % des apports recommandés. Si on considère les références de l'Union Européenne, on remarque que la consommation de 100g d'arachide permet de combler les apports recommandés en cuivre, manganèse et vitamine B9 (figure I.9).

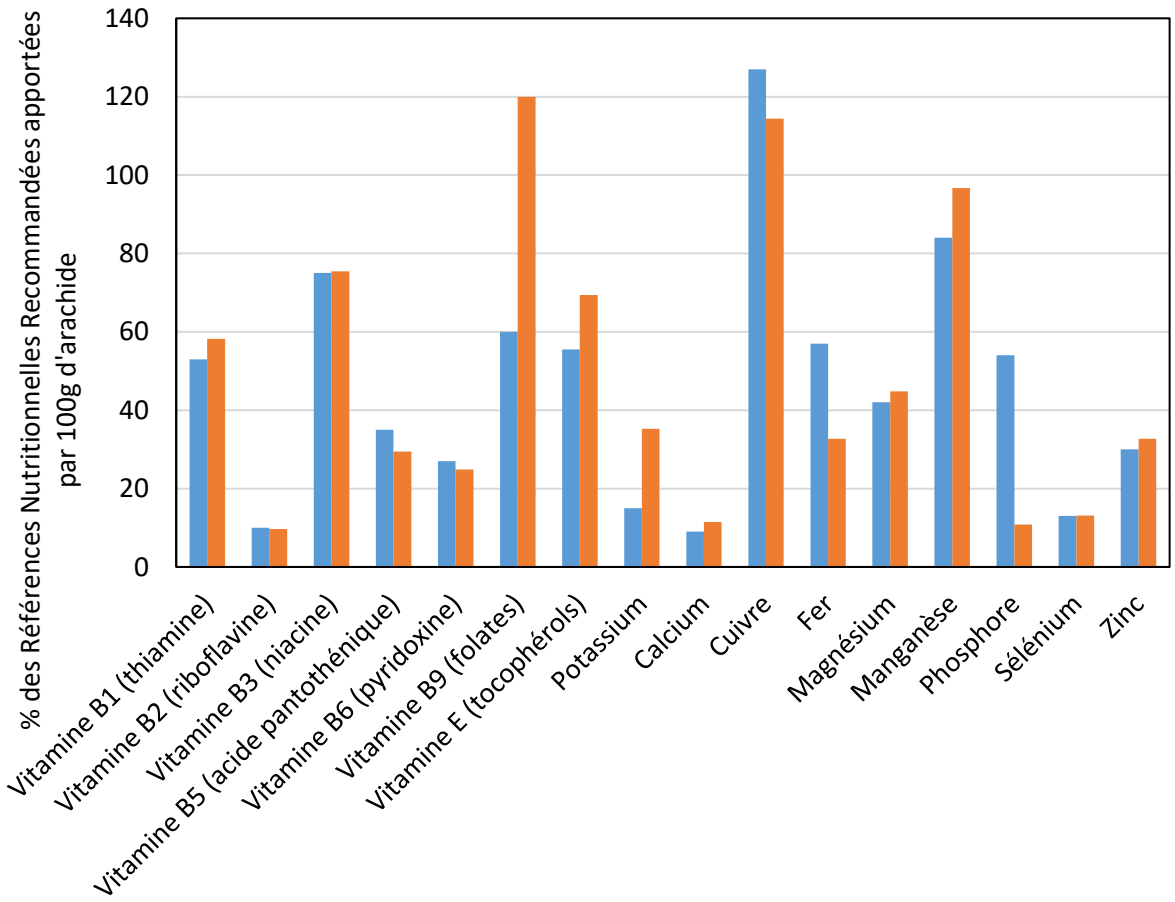


Figure I.9 : Apport de l'arachide en micronutriments par rapport aux références nutritionnelles de l'USDA (en bleu) et de l'Union Européenne (en orange). Source : Arrêté portant application du décret n° 93-1130, 2012; USDA, 2016)

L'ensemble des éléments de composition évoqués ci-dessus montre l'intérêt nutritionnel de l'arachide pour l'alimentation humaine. Il est donc important de s'intéresser également à l'acceptabilité de ce produit par les consommateurs, notamment en termes de flaveur et de couleur.

La graine d'arachide dépelliculée contient plus de deux cents composés aromatiques, dont quatre principaux : la 2,6-diméthylpyrazine, le guaiacol, le phénylacétaldéhyde et la 2,3-diéthyl-5-méthylpyrazine, lesquels sont respectivement responsables des notes « noix/terre », « brûlé », « floral » et « grillé » de l'arachide (Schirack et al., 2006a). Ces notes sont renforcées lors du traitement thermique de l'arachide, et l'on constate l'apparition de cinq pyrazines supplémentaires (la méthylpyrazine ; la 2,5-diméthylpyrazine ; la 2-méthyl-5-éthlypyrazine ; la triméthylpyrazine et la 2,5-diméthyl-3-éthylpyrazine) et d'un pyrrole (le N-méthylpyrrole), tous à l'origine de la note « noix grillée » recherchée par les consommateurs dans l'arachide, ainsi que la disparition de l'hexanal et de l'acide acétique, responsables respectivement des notes « végétal/herbe coupée » et « vinaigre » (Chetschik et al., 2010; Mason et al., 1966; Schirack et al., 2006b).

La couleur de l'arachide, quant à elle, est principalement due à la présence de composés phénoliques et de caroténoïdes dans la graine. La concentration en caroténoïdes de l'huile d'arachide est comprise entre 0,1 et 0,2 mg par kg d'huile (Pattee et al., 1969; Pattee and Purcell, 1967), les principaux étant la lutéine (50 %) et le β-carotène (25 %), suivis par la zéaxanthine et la β-cryptoxanthine (<10 %). Les composés phénoliques de l'arachide sont principalement localisés dans la peau qui entoure les cotylédons, avec une teneur de 160 mg par gramme de peau (en équivalent acide gallique, GAE/g), contre 13 mg par gramme de graine (GAE/g) dans le cotylédon. Lors d'un traitement thermique, le brunissement de l'arachide est le fait des réactions de Maillard qui impliquent les sucres réducteurs et les peptides de la graine (Carrín and Carelli, 2010; Hathorn and Sanders, 2012). Il est intéressant de noter que bien que la couleur claire naturelle de la graine (L*≈70) soit appréciée par les consommateurs, un léger brunissement (L*≈50-55) est davantage revendiqué (Bagheri et al., 2019; Shi et al., 2017b).

Le traitement thermique de l'arachide, en plus de présenter un avantage dans la stabilisation microbiologique des produits à base d'arachide, permet donc également d'obtenir des qualités organoleptiques – flaveur et couleur notamment – recherchées par le consommateur.

I.2 Solubilité et extraction des protéines de légumineuses

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les protéines de la graine d'arachide étaient localisées dans des structures sphériques de petite taille, les aleurones. L'extraction des protéines contenues dans la graine, qui doit permettre leur mobilisation ultérieure dans des processus de structuration, implique la mise en place d'une stratégie d'extraction reposant sur plusieurs étapes qui sont décrites dans cette section.

Le processus décrit ici prend en compte les étapes de transformation successivement mises en œuvre, depuis la récolte du fruit et le prétraitement de la graine jusqu'à la solubilisation partielle des protéines et leur récupération. Ces traitements peuvent permettre de moduler la solubilité des protéines, permettant l'obtention d'extraits protéiques différenciés en termes de composition et de fonctionnalité, notamment pour la structuration de matrice alimentaires.

I.2.1 Prétraitement du fruit jusqu'à la graine dépelliculée

Pour tout type d'utilisation des graines de légumineuses et de leurs composants, on retrouve initialement une même succession d'étapes décrites ci-dessous.

Dans un premier temps, l'étape de **tri** à la suite de la récolte permet d'éliminer les impuretés présentes dans un stock d'arachide, telle que poussière, sable, feuilles, tiges, vers, etc.

Ensuite, le **décorticage** se fait le plus souvent par succession d'étapes de frottement des arachides contre des tamis. Les coques, plus légères, sont soufflées par un flux d'air tandis que les graines tombent dans le tamis suivant, où l'opération est renouvelée jusqu'à l'élimination complète des coques (Stalker and Wilson, 2016).

Dans l'utilisation industrielle qui nous intéresse, il est également nécessaire de retirer la pellicule qui entoure la graine, car cette dernière contient des facteurs antinutritionnels comme des inhibiteurs de l'α-amylase et des tannins. Ce procédé s'appelle le **blanchiment** et s'effectue généralement entre 50°C et 120°C, à sec ou par trempage dans de l'eau avec des ratios arachide:eau de 1:3 à 1:10 (p/p). Le blanchiment par trempage dure de 1 à 3 heures, tandis que le blanchiment à sec peut durer de quelques secondes à plusieurs heures. Généralement, plus le traitement thermique est important, plus le temps choisi est court, mais un couple température élevée / temps long peut être choisi dans certaines applications où la graine est consommée cuite, par exemple en bouillie ou en sauce. A la suite du traitement, l'enveloppe est alors séparée à la main ou par passage dans un dispositif de

soufflerie une fois la graine sèche. Un traitement de 3 heures dans une eau de trempage à 50°C permettrait de diminuer de 25 % la concentration en facteurs antinutritionnels tels que les inhibiteurs de l'α-amylase et de diffuser l'intégralité des tannins contenus dans la graine dans l'eau de trempage (Ejigui et al., 2005). Le blanchiment présente de nombreux autres avantages, tels que l'arrêt complet de la croissance des champignons et la diminution de 72 à 78 % du taux d'aflatoxines produites au cours du stockage (Darko et al., 2018). Cette technique permet également d'allonger la durée de conservation de la graine en stoppant l'activité enzymatique résiduelle (Schirack et al., 2006b) et en améliorant la stabilité de l'huile à l'oxydation par la génération de composés antioxydants et antibactériens tels que l'α-limonène, le γ-terpinène et le *p*-cymène à des concentrations massiques comprises entre 55 et 70 µg/100g d'huile, comme mesuré lors d'un blanchiment à sec (de Camargo et al., 2016). Il en résulte des temps de conservation du produit plus longs. Ainsi une graine blanchie à sec peut se conserver 200 jours à 25°C contre 100 jours pour une graine blanchie par trempage et séchée (Angelo et al., 1977). Enfin, le choix des conditions de prétraitement conditionne également les propriétés organoleptiques de la graine. En effet, lors du blanchiment, une température élevée (95°C à 110°C) et un temps de traitement court (10 minutes) permettent également de ne pas développer de flaveurs non désirées comme la note « torréfiée » ou « brûlée » et de conserver les deux cotylédons de la graine ensemble, ce qui est préféré dans certaines utilisations telles que la production de snacks (Hoover, 1979; Schirack et al., 2006b).

I.2.2 Traitements à sec de la graine dépelliculée

La graine dépelliculée peut subir de nouvelles étapes de traitements thermiques et/ou de broyage voire de fractionnement, tel que le pressage qui permet de séparer l'huile de la graine et ainsi de la valoriser séparément (Nautiyal, 2002). Ils sont le plus souvent appliqués en amont de traitements en phase humide.

Le **traitement thermique** le plus couramment utilisé est le grillage à sec des graines d'arachide, bien qu'il existe également des produits à base d'arachide bouillie ou frite (Beyer et al., 2001; Shi et al., 2017a). Le grillage à sec est notamment employé lors de la préparation de snacks et de beurre de cacahuètes. Ce traitement thermique permet d'éliminer les flaveurs indésirables telles que les notes « bois » et « coque », ainsi que de développer des notes « toastées » jugées désirables par le consommateurs (Hathorn and Sanders, 2012). Il permet également le développement d'un brunissement qui peut être recherché. Il peut s'effectuer en batch dans un grill ou en procédé continu dans un four, par ventilation d'air chaud entre 150 et 200°C pendant des durées variables, entre 10

et 60 minutes (Shi et al., 2018, 2017a; Verma et al., 2012). Cette étape de traitement thermique a également un effet contrasté sur l'allergénicité de la graine d'arachide, le procédé pouvant réduire l'allergénicité des protéines par modification de l'accès aux épitopes ou au contraire la renforcer par formation de néo-antigènes (figure I.10). Il a été observé qu'un grillage à sec augmentait le potentiel allergénique des trois principaux allergènes de l'arachide (Arah1 (conarachine), Arah2 (albumine) et Arah3 (arachine)) tandis qu'un traitement thermique par ébullition ou par friture réduisait ce potentiel allergène (Verma et al., 2012). On note ainsi une plus grande prévalence de réactions allergiques à l'arachide aux Etats-Unis qu'en Chine par exemple, l'arachide étant principalement consommée grillée et non bouillie (Beyer et al., 2001; Mondoulet et al., 2005).

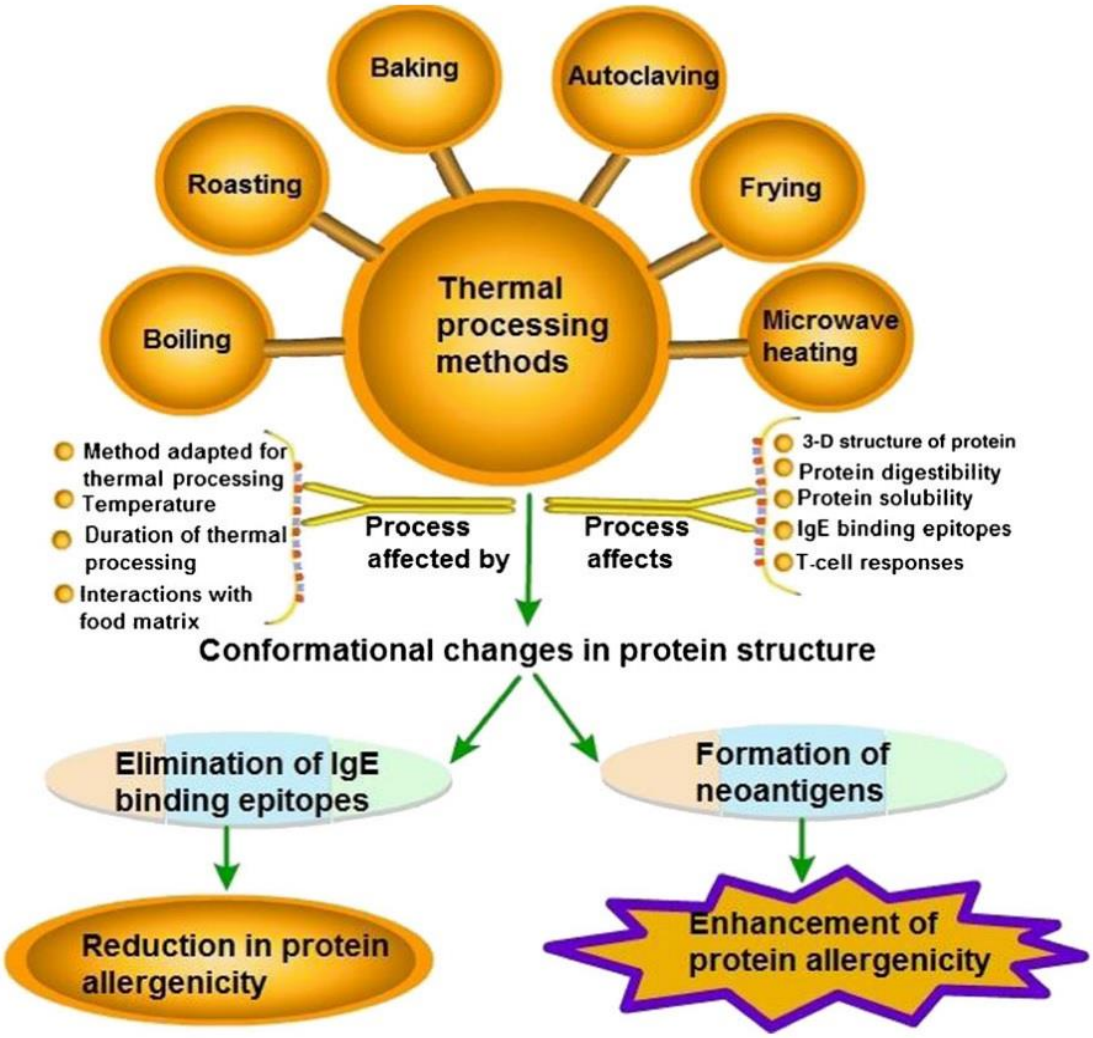


Figure I.10 : Impact du traitement thermique sur l'allergénicité des protéines de légumineuses. Source: Verma et al., 2012

Le **broyage** de la graine d'arachide constitue une étape préliminaire nécessaire dans le cas de procédés de fractionnement, aussi bien à des fins analytiques qu'en amont d'une opération de pressage permettant d'obtenir une phase huile et un tourteau, produits intermédiaires qui pourront

ensuite entrer dans la formulation de produits alimentaires. Le broyage à sec de l'arachide est effectué par passage des graines à travers des couteaux ou des marteaux dont le nombre et la vitesse de rotation déterminent la finesse du broyage et permettent de sélectionner la taille maximale des particules présentes dans la pâte en sortie de procédé. L'utilisation de broyeurs à impact permet cependant d'obtenir des granulométries plus fines, comme indiqué sur la figure I.11.

Pour l'arachide comme pour les oléagineux (et à la différence des autres légumineuses qui, elles, sont pauvres en lipides), le produit est ensuite pressé pour éliminer l'huile avant de pouvoir réaliser une séparation à l'air permettant de fractionner la farine et de récupérer notamment une fraction fine, qui s'apparente alors à une « farine riche en protéines ». Cette farine peut par la suite être **raffinée** en séparant les grains d'amidon et les fibres par une séparation à air. La fraction fine obtenue comprend alors environ deux fois plus de protéines (en g/g de matière) que la graine initiale (Schutyser et al., 2015). L'efficacité de cette séparation dépend de la finesse du broyage en amont de l'extraction (Pelgrom et al., 2015) (Kaysi and Melcion, 1992).

Les différents procédés de broyage utilisés sont présentés dans la figure I.11.

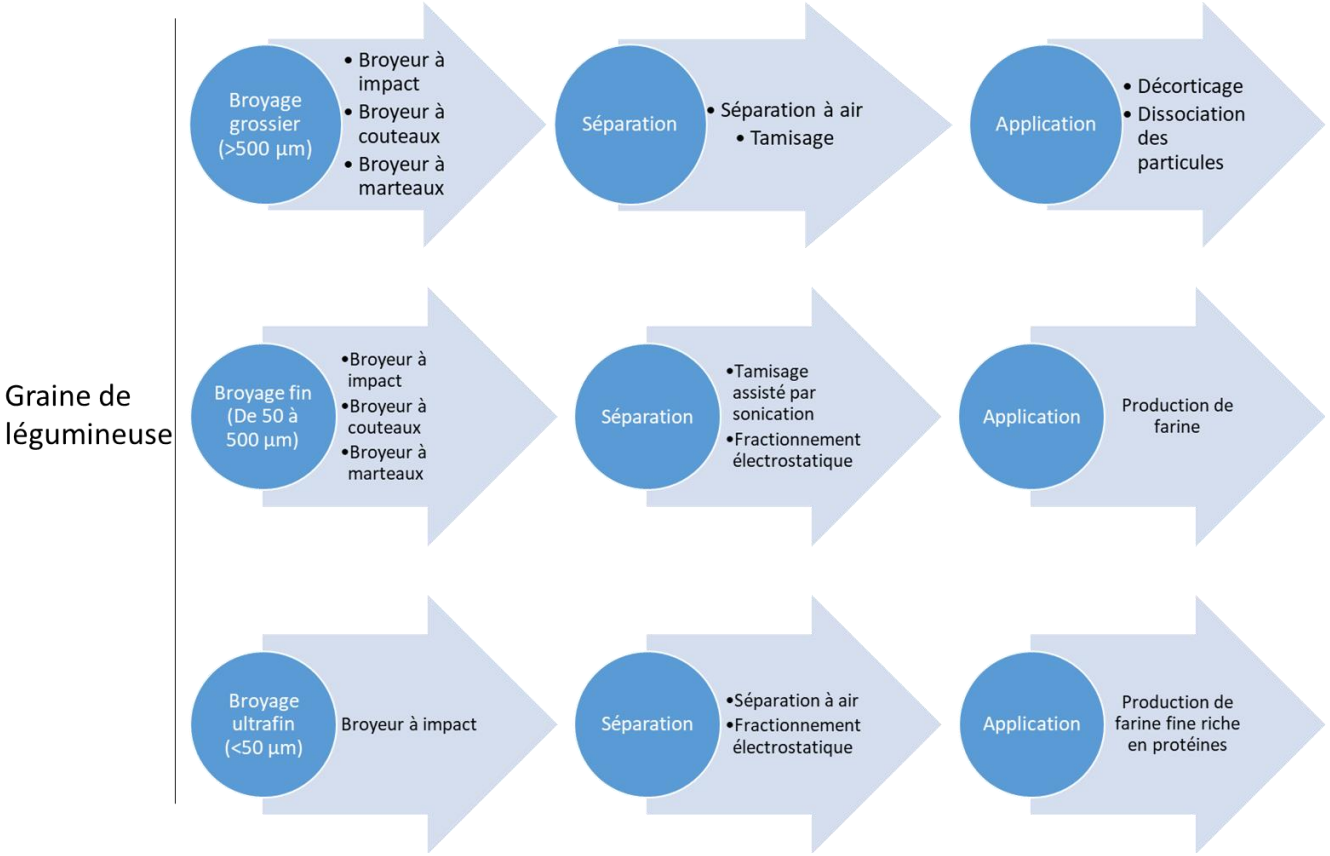


Figure I.11 : Procédés de séparation en voie sèche applicable aux graines de légumineuses en voie sèche et leurs applications (adapté de Chéreau et al., 2016)

La pâte obtenue en sortie du broyeur peut également être mélangée à de l'eau afin d'obtenir une suspension liquide.

I.2.3 Solubilisation et extraction des protéines

I.2.3.1 Solubilisation des protéines

A partir d'une farine obtenue par broyage de graines ou de tourteau délipidé, il est possible d'obtenir des isolats ou des concentrats de protéines en voie humide. Deux méthodes sont reportées dans la littérature pour cela : l'extraction à pH acide ou basique et l'extraction en milieu salin (Kain et al., 2009; Klupšaitė and Juodeikienė, 2015; Preece et al., 2017; Stone et al., 2015). La concentration en protéines de la phase aqueuse à la fin de ces étapes dépend des paramètres sélectionnés (pH, force ionique) en milieu aqueux ainsi que des différents traitements préalablement appliquées à la graine sèche (Vishwanathan et al., 2011). Outre la concentration en protéines extraites, le choix des méthodes et paramètres d'extraction permet de sélectionner des protéines selon leurs fonctionnalités pour les engager par la suite dans des systèmes de type émulsions, mousses ou gels.

Les globulines constituant dans les légumineuses la fraction protéique majoritaire (55 % à 90 % des protéines), ce sont généralement celles-ci que l'on cherche à solubiliser (Chéreau et al., 2016). La solubilisation des protéines en fonction du pH peut se faire en milieu alcalin ou en milieu acide. Les pH d'extraction doivent être suffisamment éloignés du point isoélectrique (pI) des globulines de l'arachide qui se situe entre 3 et 5 (Boye et al., 2010; Kain et al., 2009; Shafiqur et al., 2018; Yuliana et al., 2014). Après avoir préalablement isolés 3 types de globulines (arachine, conarachine I et conarachine II), Monteiro et Prakrash (1994) ont étudié leur solubilité en solution aqueuse ou légèrement saline en fonction du pH (figure I.12). On y voit comme attendu que leur solubilité est minimale à un pH~3-5, soit proche de leur pI. L'arachine (en cercles noirs pleins) atteint un maximum de solubilité de 90 % dans l'eau à pH 2, tandis que les conarachines (triangles et carrés vides) atteignent un maximum proche de 95 % à pH 10. Dans une solution saline à 0,2 mol/L, la solubilité de l'arachine et de la conarachine ne dépassent respectivement pas 45 et 60 % à pH acide, et les deux globulines atteignent une solubilité proche de 90 % à pH~8.

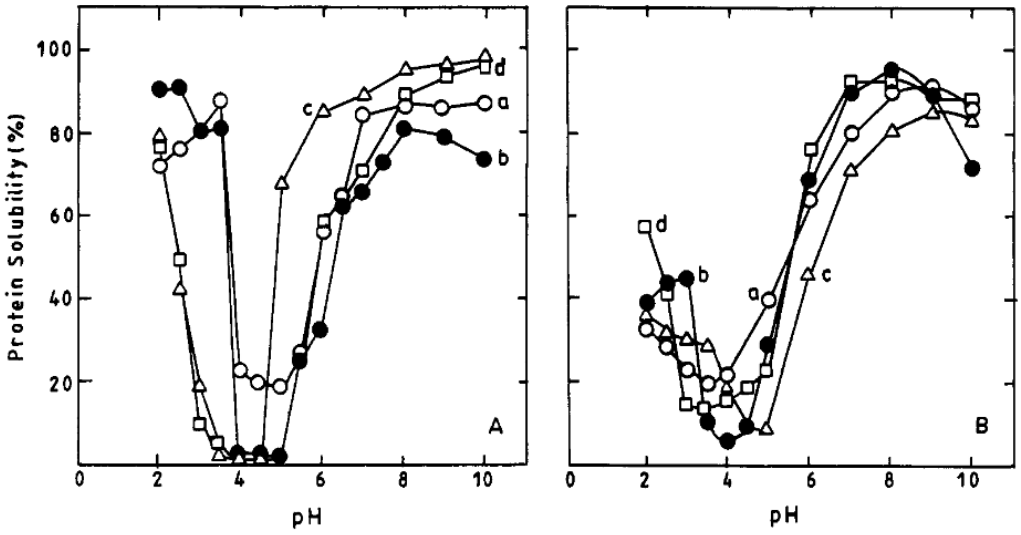


Figure I.12 Courbes de solubilité des globulines de l'arachide en fonction du pH dans de l'eau (A) et dans une solution saline (NaCl 0,2 mol/L) (B). a : protéines totales ; b :arachine ; c : conarachine II ; d : conarachine I (Monteiro and Prakash, 1994)

A pH élevé, la charge nette des protéines est négative, ce qui génère des répulsion électrostatiques entre les protéines, limitant leur agrégation et favorisant leur solubilité (Sun and Arntfield, 2011). Ces protéines peuvent ainsi être solubilisées et séparées des fractions insolubles telles que les fibres insolubles, l'amidon et les protéines insolubles (Boye et al., 2010; Klupšaitė and Juodeikienė, 2015).

La solubilité des protéines de pois, qui présentent des similitudes avec les protéines d'arachide, a été particulièrement étudiée. Leur extraction à pH 3,5 6,5 et 7,5 est cinq fois plus importante qu'à pH 4,5 et 5,5 (Peng et al., 2020). Outre les quantités extraites, les pH d'extraction peuvent également moduler les propriétés fonctionnelles des extraits, telles que la capacité de rétention d'eau ou la température de dénaturation, ce qui peut être attribué à des différences de solubilité, en fonction du pH, entre les différentes familles de protéines présentes dans la graine.

Une autre méthode d'extraction repose sur une modification de la force ionique et des principes de salting-in et salting-out des protéines. Par l'ajout d'un sel dans le milieu et sa dissociation en ions, on augmente la force ionique d'une solution. La force ionique *I* d'une solution est définie par l'équation suivante :

$$I = {}^{1}/_{2} \sum c_i \, z_i^2 \qquad (1)$$

avec c_i la concentration molaire d'un ion i en mol/L, et z_i le nombre de charge de cet ion (grandeur sans unité) (Lewis and Randall, 1962).

A faible concentration en sel, les ions se lient aux protéines, ce qui a pour effet d'augmenter leur niveau d'hydratation et donc leur solubilité. C'est le phénomène de « salting-in ». A l'inverse, lorsque la concentration en sel devient élevée, et donc lorsque le nombre d'ions en solution augmente et passe un certain seuil, il y a compétition entre les ions et les protéines vis-à-vis de l'eau, ce qui va favoriser les interactions protéines-protéines. L'augmentation de la teneur en sel favorise alors l'agrégation des protéines, dont la solubilité diminue : c'est le phénomène de « salting-out » (figure I.13).

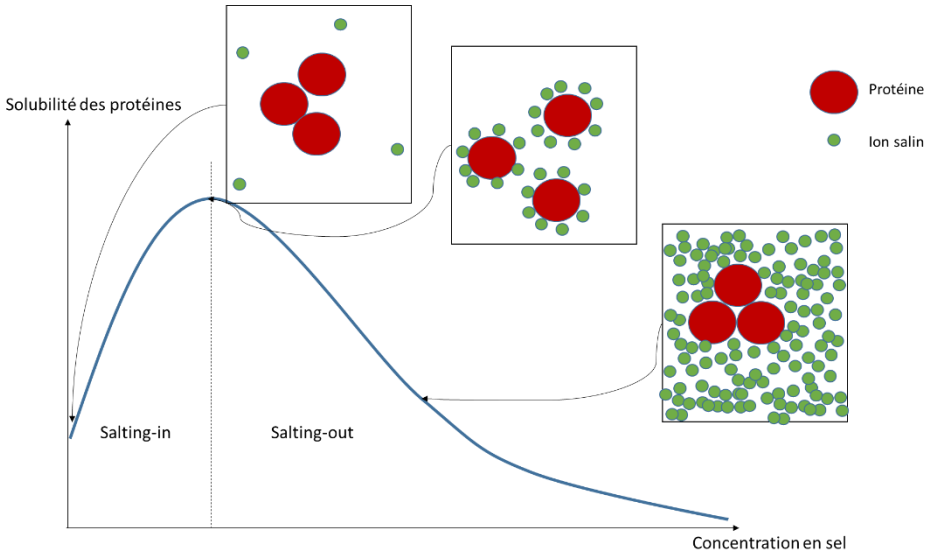


Figure 1.13: Solubilisation et précipitation des protéines par salting in et salting out

La classification d'Osborne permet de classer les protéines en fonction de leur solubilité séquentielle dans différents solvants. Elle peut s'appliquer à des protéines d'oléagineux, de céréales ou de légumineuses. Ainsi, les albumines sont solubilisées dans l'eau, puis les globulines dans des solutions salines (Chéreau et al., 2016). Ces dernières étant majoritaires dans les légumineuses, le choix est généralement fait de favoriser la solubilisation des protéines par l'ajout de sel. Les globulines de l'arachide sont le plus souvent solubilisées toutes ensemble dans une solution saline (NaCl 100 mg/L) puis séparées les unes des autres lors de l'extraction, par précipitation à différentes gammes de forces ioniques (Bhushan and Agarwal, 2008; Wang, 2017). L'effet du type d'ion sur la stabilisation ou la déstabilisation des protéines suit la série de Hofmeister (figure I.14). Le type d'ions a ainsi un effet sur la solubilisation des protéines. L'utilisation de cations bivalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) permet d'extraire 18 à 22 % plus de protéines de colza (en masse) que des cations monovalents (K^{+} et Na^{+}), ceci à la même force ionique (Romero-Guzmán et al., 2020). Les protéines extraites sont également moins agrégées car les cations divalents peuvent rompre interactions électrostatiques inter-protéines et ainsi augmenter leur solubilisation et leur extraction.

A

Stabilisent les protéines	Déstabilisent les protéines
Anions : SO_4^{2-} - HPO_4^{2-} - CH_3COO^- - F^-	Cl^- - Br^- - NO_3^- - I^- - ClO_4^- - SCN^-
Kosmotropes	Chaotropes
Cations: Ca^{2+}- Mg^{2+} - Li^+ - Na^+	K^+ - NH_4^+ - $(CH_3)_4N^+$
Déstabilisent les protéines	Stabilisent les protéines

B	Ions Kosmotropes	Ions Chaotropes
Taille	Petits	Grands
Charge de surface	Importante	Faible
Hydratation	Forte	Faible

Figure I.14 : Série de Hofmeister (A) et propriétés des ions kosmotropes et chaotropes (B). D'après Hofmeister, 1888; Yang, 2009

De façon générale, la solubilisation des protéines est donc obtenue par dispersion d'une farine dans une solution aqueuse de pH et force ionique contrôlés. La phase aqueuse, dans laquelle sont solubilisées les protéines, est ensuite séparée des éléments insolubles de la farine par centrifugation ou filtration.

I.2.3.2 Fractionnement des protéines solubilisées

Les protéines solubilisées, comme décrit précédemment, peuvent ensuite être fractionnées selon différentes méthodes.

Dans le cas d'une solubilisation des protéines à un pH éloigné de leur point isoélectrique (pHi), l'extrait soluble peut ensuite être ramené à un pH proche de leur pHi afin de les précipiter (figure I.12). Ces dernières sont alors récupérées par une nouvelle centrifugation, lavées afin d'enlever les sels résiduels, puis séchées.

Il est également possible de récupérer les protéines solubilisées par ultrafiltration. Il s'agit d'un procédé membranaire permettant de séparer des protéines de tailles comprises entre 1 et 1000 kDa. L'extrait protéique est alors séparé des autres éléments solubilisés, et une protéine spécifique peut

être sélectionnée selon sa taille en fonction la membrane sélectionnée (Boye et al., 2010; Klupšaitė and Juodeikienė, 2015).

Dans le cas de la solubilisation des protéines par salting-in, le surnageant contenant les protéines solubles peut être dessalé par dialyse ou « micellisation », puis séché afin d'obtenir un isolat protéique. La dialyse est un procédé de séparation membranaire utilisant une membrane perméable aux seuls solutés de faible poids moléculaires (dans ce cas, les sels), qui la traversent sous l'effet d'un gradient de potentiel chimique. La solution de protéines obtenue à l'issue de la dialyse est donc équilibrée à la force ionique du bain de dialyse utilisé (Surendar, 1982). La « micellisation » consiste à diluer la solution de protéines avec de l'eau froide (4°C) dans un ratio solution de protéines:eau compris entre 1:3 et 1:10 (v/v) (Murray et al., 1981). La réduction de la force ionique qui accompagne la dilution conduit à une insolubilisation des protéines, lesquelles forment des agrégats de faibles poids moléculaires qui, à une concentration critique en protéines, se réassocient sous forme de micelles (Lam et al., 2018). Cette méthode de « micellisation » permet d'extraire 35 % et 40 % des protéines totales de légumineuses (cas du niébé et pois d'Angole, respectivement), soit des valeurs comparables aux quantités extraites par extraction alcaline (Mwasaru et al., 1999). Concernant les globulines de l'arachide, suite à une solubilisation par salting-in, elles sont le plus souvent séparées les unes des autres par précipitation différentielle ou salting-out en gradient, *via* différentes concentrations de sulfate d'ammonium. Ainsi, un gradient de concentrations croissantes en $(NH_4)_2SO_4$ permet de récupérer préférentiellement, à partir d'isolat de protéines, la conarachine II (à 0,2 mol/L), puis la conarachine I (à 0,4 mol/L), et enfin l'arachine (>0,4 mol/L) (Chiou, 1990; Daussant et al., 1969; Liu et al., 2011; Prakash and Rao, 1986; Wang, 2017).

Les différents procédés de traitement des graines et d'extraction des protéines étudiés ici sont résumés en figure I.15.

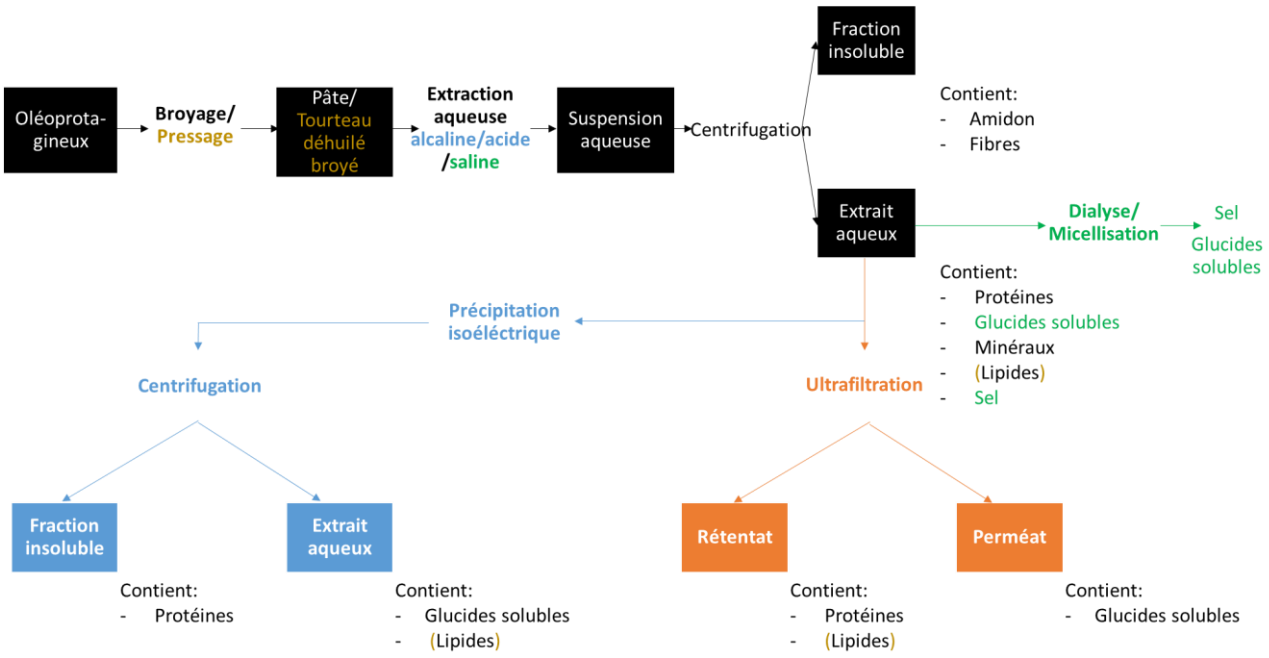


Figure I.15 : Procédé d'extraction en phase aqueuse des protéines d'oléoprotéagineux. D'après Boye et al., 2010; Chéreau et al., 2016; Morel et al., 2016

Les protéines extraites peuvent ensuite être engagées dans la formation de gels ou d'émulsions, en stabilisant une interface eau/huile par exemple. L'efficacité de ces phénomènes de structuration dépend notamment de la structure primaire et tertiaire des protéines.

I.3 Propriétés fonctionnelles et structuration de systèmes protéiques

Les protéines sont des polymères décrits par leurs structures primaire, secondaire et tertiaire. La structure primaire correspond à la séquence linéaire d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. La structure secondaire correspond à une conformation de la protéine en structures stabilisées par des liaisons hydrogène, principalement des hélices α et feuillets β. Enfin, la structure tertiaire correspond à l'organisation tridimensionnelle de la protéine (Schwenke, 1998), qui peut être stabilisée par des liaisons faibles comme par des liaisons covalentes de type pont disulfure. Il est également fait mention d'une structure quaternaire qui prend en compte la possible association de plusieurs protéines par le biais d'interactions faibles telles que des liaisons hydrogène, hydrophobes ou électrostatiques (Creighton, 1993).

La liaison hydrogène joue un rôle essentiel dans les systèmes vivants. Elle se forme lorsqu'un atome accepteur électronégatif présentant une paire d'électrons non liés interagit avec la charge δ+ d'un atome d'hydrogène H, naturellement déjà engagé dans une liaison covalente polaire avec un atome donneur électronégatif. Cette liaison faible se forme donc entre des atomes donneurs et accepteurs. Une liaison hydrogène mesure généralement entre 0,26 et 0,31 nm de longueur, et présente une force de 4,2 à 8,4 kJ/mol en milieu aqueux (Lodish et al., 2014).

La liaison ionique résulte de l'interaction entre un cation (chargé positivement) et un anion (chargé négativement). Dans l'eau, cette liaison entre deux atomes présentant des charges opposées entre elles, mesure environ 0,3 nm et a une force de l'ordre de 5,9 kJ/mol (Berg et al., 2002).

Les forces de Van der Waals sont des interactions non spécifiques entre deux atomes. Le mouvement et la distribution aléatoire des électrons autour d'un atome induit la présence d'un dipôle électrique. Lorsque les nuages électroniques de deux dipôles se rencontrent, une liaison de Van der Waals s'installe. Cette liaison peut se produire entre deux dipôles permanents qui se rencontrent (force de Keesom), entre un dipôle permanent qui en induit un second lors de son croisement avec le nuage électronique d'un autre atome à proximité (force de Debye) et entre deux dipôles induits (force de London) (Casimir and Polder, 1948; Dzyaloshinskii et al., 1992). Les interactions de Van der Waals sont particulièrement faibles, d'une force d'environ 4,2 kJ/mol. La distance dépend du rayon des nuages électroniques des atomes concernés. Elle est par exemple de 0,27 nm entre un atome C et un atome H et de 0,34 nm entre 2 atomes C (Lodish et al., 2014).

Enfin, la liaison hydrophobe intervient entre des résidus hydrophobes (dans le cas des protéines, des acides aminés hydrophobes). Incapables de former des liaisons avec le solvant en présence, ces zones hydrophobes s'associent entre elle. La distance et la force de cette interaction dépendent donc grandement des molécules concernées. A titre d'exemple, elle a pu être mesurée pour des acides aminés apolaires à des forces de 6,3 à 21 kJ/mol et des longueurs de 3 à 14 nm (Némethy and Scheraga, 1962; Pace et al., 2014; Tanford, 1962). La force de l'interaction diminue avec sa longueur (Israelachvili, 2011).

Bien que ces liaisons faibles soient à l'origine de la plupart des processus biologiques dans la nature, il existe également des liaisons fortes, notamment importantes dans la structuration primaire et tertiaire des protéines et, dans certains cas, d'interactions protéines-protéines. Il s'agit, pour la structuration primaire des protéines, des liaisons peptidiques qui lient les acides aminés entre eux *via* leurs extrémités N- et C-terminales : longueur de 0,13 nm et force de ~200 kJ/mol (Pauling, 1960). Ces liaisons peptidiques peuvent également intervenir entre deux protéines lors de l'utilisation d'une enzyme comme la transglutaminase. Enfin, un second type de liaison covalente d'intérêt dans l'étude des protéines est le pont disulfure. Cette liaison s'établit entre des cystéines, acides aminés soufrés porteurs d'une fonction thiol. Les ponts disulfures peuvent être de types intra-protéines, et impliqués dans la stabilisation de la structure tertiaire des protéines, mais aussi inter-protéines, par exemple s'ils sont formés au cours de l'agrégation thermique. Il s'agit d'une liaison d'une longueur de l'ordre de 0,2 nm et dont force de liaison dépend du nombre de résidus engagés dans la boucle formée par la liaison et de l'angle diédral (de torsion) formé par la liaison. On note ainsi des forces de liaison allant de 30 à 90 kJ/mol (Karimi et al., 2016).

I.3.1 Propriétés gélifiantes

Un gel de protéines est un réseau interconnecté de protéines occupant tout l'espace d'un volume fini et formant ainsi une structure tridimensionnelle au sein de laquelle le liquide (le plus souvent de l'eau, on parle alors d'hydrogel) est piégé. Le matériau gélifié présente des propriétés mécaniques solides, tout en conservant certaines propriétés de sa composante liquide, on parle de solide viscoélastique (Ferry, 1948; Ziegler and Foegeding, 1990). Les propriétés d'un gel dépendent de facteurs intrinsèques aux protéines qui le composent (hydrophobicité, charge, ponts disulfures, poids moléculaires, composition en acides aminés) et de facteurs externes, tels que la concentration en

protéines, le pH, la température, la pression, la force ionique et le type d'ions en présence (Totosaus et al., 2002).

Les processus de gélification des protéines sont impliqués dans la formation de nombreux produits alimentaires tels que le surimi, les fromages, le yaourt ou le tofu (van der Linden and Foegeding, 2009). La diversité des protéines et des procédés utilisés permet d'obtenir une large gamme de produits, avec diverses propriétés de structure, de texture et d'appréciation sensorielle (Foegeding, 2015).

Trois procédés sont couramment utilisés afin de former des hydrogels de protéines : un traitement thermique (au-delà de la température de dénaturation des protéines), une acidification (par ajout d'un acidifiant ou par fermentation bactérienne) et une réaction enzymatique (par ajout d'une enzyme capable de former des liaisons covalentes entre les protéines) (Ben-Harb et al., 2018; Totosaus et al., 2002).

I.3.1.1 Gélification thermique

La gélification des protéines par traitement thermique est une des voies principales de formation de gels de protéines. Le principe est le suivant : à une température supérieure à leur température de dénaturation, les protéines globulaires (dont la structure interne est stabilisée par des ponts disulfures, des liaisons hydrogènes et des forces de Van der Waals) perdent leur structure native : elles se déplient et exposent les résidus jusqu'alors enfouis dans la structure globulaire. Ce dépliement permet d'exposer les groupements hydrophobes ainsi que certains groupements SH qui peuvent être situés au cœur de la structure. Les protéines s'agrègent alors en un réseau tridimensionnel *via* des interactions non covalentes et covalentes (liaisons S-S). Il s'agit donc d'un procédé en deux étapes : dénaturation des protéines puis agrégation (Totosaus et al., 2002). La structure du gel dépend de la cinétique de chacune des étapes et de la nature des protéines, ainsi que du pH et de la force ionique du milieu (Utsumi and Kinsella, 1985). Par exemple, pour une même température de traitement thermique, il a été observé sur des protéines de pois qu'un chauffage plus lent permettait au réseau de se former à des températures plus basses (point de gel à 61°C lors d'un chauffage à 0,5°C/min, contre 84°C lors d'un chauffage à 4°C/min) (Sun and Arntfield, 2010). Sur ces mêmes protéines, les auteurs ont observé qu'un refroidissement plus lent (0,5°C/min au lieu de 2°C/min) permettait au réseau de mieux se former, avec pour effet un module élastique cinq fois plus important, de 2 000 Pa

(refroidissement à 2°C/min) à 10 000 Pa (refroidissement à 0,5°C/min), pour une concentration en protéines de 12 g/100 mL chauffées à 95°C (Sun and Arntfield, 2012). Les auteurs expliquent cela par l'implication de ponts disulfures (liaison forte) dans le réseau pour une vitesse de refroidissement ≤ 1°C/min, tandis qu'ils n'ont pas le temps de se former (ou de façon minoritaire) lors de refroidissements plus rapides. Pour un refroidissement rapide (≥1°C/min), ce sont les liaisons hydrogènes et hydrophobes qui pilotent le module élastique du gel.

Le pH est susceptible de modifier l'agrégation des protéines lors d'un traitement thermique. Comme illustré en figure 1.16, à un pH éloigné du pHi des protéines, on observe un déroulement de la structure des protéines du fait des répulsions électrostatiques au sein de la protéine, ce qui favorise la formation d'un gel filamenteux. Ce type de gel se structure en chaînes linéaires de protéines, d'épaisseur et d'élasticité variables. Le même processus peut être observé à faible force ionique. A l'inverse, à un pH proche du pHi, les répulsions électrostatiques sont faibles et les protéines dénaturées se présentent sous une structure repliée. Le gel est alors formé par agrégation de particules partiellement sphériques (Lefèvre and Subirade, 2000; Morris, 2009; Yang, 2016).

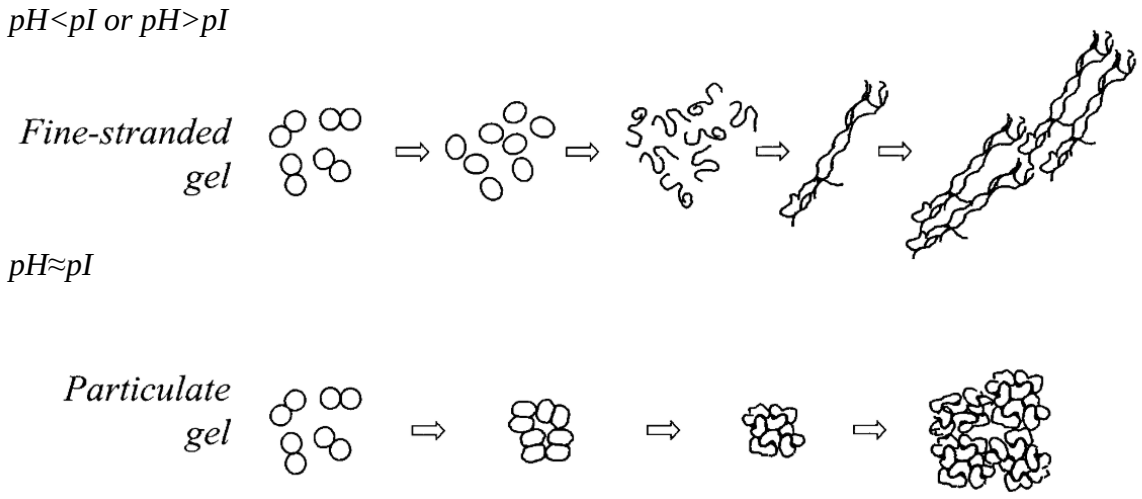


Figure I.16 : Gélification de β-lactoglobuline par traitement thermique : impact du pH sur la structuration du gel au cours du traitement. Adapté de Lefèvre and Subirade, 2000

Il est généralement observé que les gels filamenteux ont une force de gel, une élasticité et une capacité de rétention d'eau (CRE) plus importantes que les gels particulaires. Ces derniers sont plus grossiers (taille de pores comprise entre 1,5 et 2,0 µm, contre 0,02 à 0,12 µm pour des gels filamenteux) et forment des structures plus opaques (Urbonaite et al., 2016).

De par leur concentration importante, notamment chez les végétaux, les globulines sont des protéines particulièrement étudiées lors de l'utilisation de ce procédé (Nicolai and Chassenieux, 2019). La

diversité de leurs structures et de leurs propriétés fonctionnelles permet, par le biais des paramètres d'extraction des protéines et de gélification, d'obtenir une grande variété de structures et de textures lors de leur gélification thermique, qu'il s'agisse de globulines animales (Chihi et al., 2016) ou végétales (Berghout et al., 2015; Nicolai and Chassenieux, 2019; O'Kane et al., 2004), voire de globulines différentes issues d'une même source végétale, comme étudié pour le soja (Renkema et al., 2001; Utsumi and Kinsella, 1985) et pour l'arachide (Wang et al., 2014).

Concernant l'arachide, ce sont les arachines et les conarachines, les deux principales familles de globulines de la graine, qui pilotent les propriétés des gels (Chiou, 1990; Wang et al., 2014). Les températures de dénaturation ont été mesurées par calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC) en milieu aqueux entre 89,4 et 95,8 °C pour la conarachine et entre 101,1 et 111,6 °C pour l'arachine, pour des concentrations en protéines allant de 60 à 5 g/100 g (Colombo et al., 2010). Cela suggère que la structure de l'arachine est plus résistante au traitement thermique que celle de la conarachine, ce qui est confirmé par d'autres travaux (Chiou, 1990; Evans et al., 1962). Il est cependant possible de former des gels à partir d'arachine par des traitement thermique à 90 et 95°C, soit entre 5 et 15°C de moins que la température de dénaturation mentionnée plus haut, ce qui pourrait suggérer que cette donnée est fortement dépendante des conditions dans lesquelles elle est étudiée (Wang et al., 2014; Wang, 2017). Concernant la conarachine, des gels peuvent être formés à partir de 85°C, soit à une température proche (2,7°C d'écart) de la température de dénaturation la plus faible mesurée par Colombo et. al..

Les gels formés par traitement thermique (90°C pendant 60 min) à partir de conarachine ont, à concentration égale en protéine, une force de gel 1,5 fois supérieure à ceux formés à partir d'arachine (Mujoo et al., 2003; Renkema et al., 2001; Wang et al., 2014). Cela pourrait traduire des différences en termes de force ou de densité de liaisons dans les gels formés à partir de ces deux types de protéines. Cette différence a été attribuée aux acides aminés soufrés : la conarachine possède 1,5 fois plus de cystéine que l'arachine, elle est donc susceptible de former plus de ponts disulfures.

I.3.1.2 Gélification par acidification

La gélification par acidification peut s'opérer sans nécessitée de chauffer le produit. L'agrégation des protéines résulte ici d'une diminution des forces de répulsion électrostatiques entre protéines. Les protéines sont souvent au préalable dénaturées et pré-agrégées par une enzyme (Li et al., 2018) ou par un traitement thermique (Lucey and Singh, 1997; Yang, 2016), formant des agrégats de petites tailles ou de longs agrégats linéaires. Le type d'agrégat formé dépend alors, comme étudié sur la gélification thermique, du pH et de la force ionique, ainsi que de la structure primaire de la protéine. Ce dernier critère est décrit en figure 1.17 avec deux protéines globulaires agrégées dans les mêmes conditions expérimentales. En effet, l'ovalbumine (panneau du bas) est connue pour former des agrégats de forme linéaire (Koseki et al., 1989), tandis que la β-lactoglobuline, protéine principale du sérum laitier (panneau du haut), est connue pour former des clusters denses lors d'une dénaturation thermique (Mehalebi, 2008). La structure des agrégats formés va par la suite avoir un impact sur la stabilisation des agrégats protéiques, laquelle dépend principalement de la composition en groupements thiols des protéines. En effet, les formes de clusters de protéines dépourvues de ces acides aminés soufrés en surface ont tendance à s'agréger en agrégats plus denses qui vont percoler sous la forme de clusters d'agrégats, avec pour conséquences, une plus grande perméabilité du réseau, une turbidité plus importante et un gel prône à la rupture à faible déformation (Alting et al., 2004, 2003).

L'acidification en elle-même est effectuée par une inoculation bactérienne susceptible de produire par fermentation des acides à partir d'un substrat présent dans le milieu, ou par l'ajout d'une molécule acidogène telle que la D-glucono-δ-lactone (GDL), susceptible de s'hydrolyser progressivement en une forme acide. L'acidification du milieu permet de se rapprocher du pHi et ainsi d'approcher une charge moyenne nette nulle en surface des protéines : les forces de répulsion sont ainsi réduites, ce qui permet diverses interactions telles que les liaisons hydrophobes, hydrogènes, les interactions de Van der Waals, voire des ponts disulfures entre protéines (Alting et al., 2004; Maltais et al., 2005).

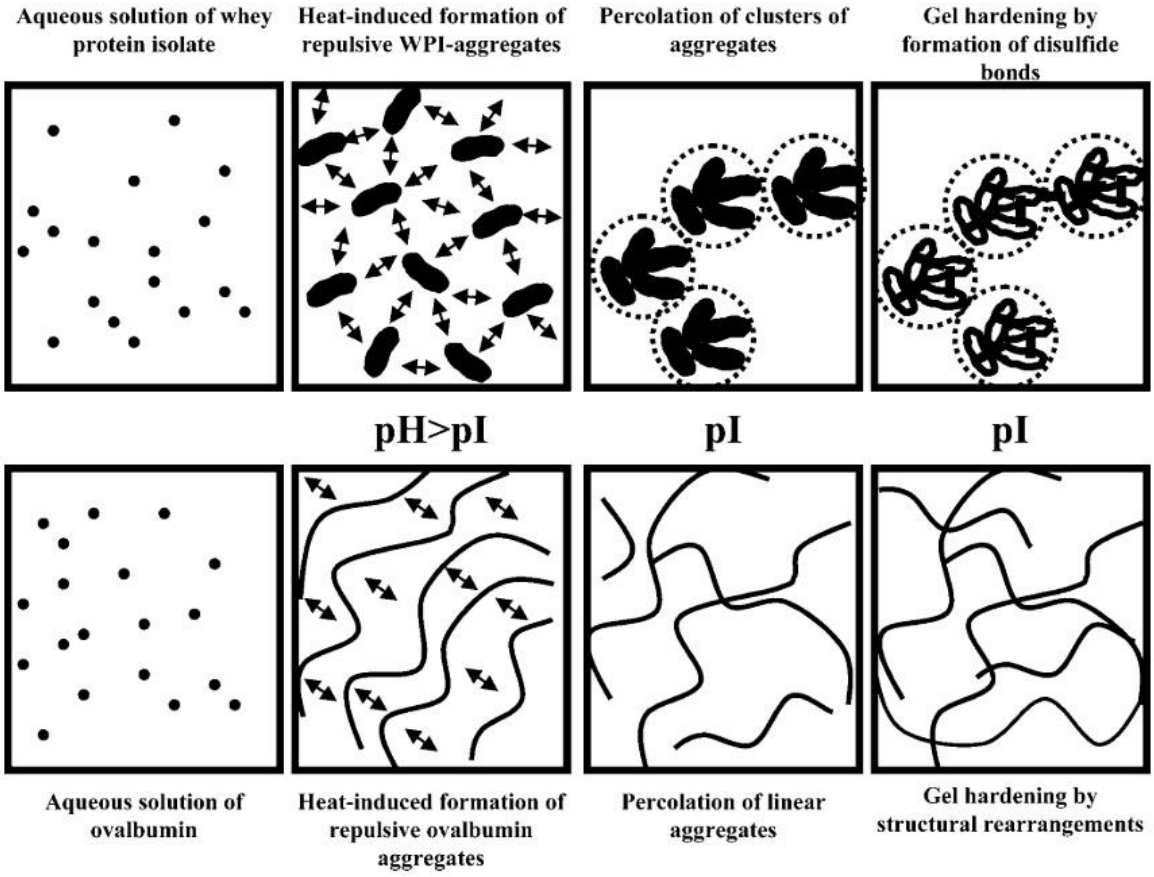


Figure I.17: Représentation de la gélification par acidification de protéines de sérum laitier (en haut) et d'ovalbumine (en bas) (Alting et al., 2004).

La gélification acide a récemment été appliquée à des isolats de protéines d'arachide. Des protéines, à des concentrations comprises entre 14 et 22 g/100 g, ont d'abord été pré-agrégées par un traitement thermique à 95°C pendant 30 minutes, dispersées dans de l'eau distillé sous action mécanique, puis gélifiées par ajout de 2 g/100 mL de GDL. Les modules conservatifs observés sont de 2900 et 670 Pa, respectivement à 22 et 14 g/100 g d'isolats de protéines (Zhu et al., 2019). Le seuil d'écoulement à la déformation est inversement corrélé à la concentration en protéines (respectivement 9,6 et 7,9 %, à des concentrations en protéines de 14 et 22 %), ce qui est indicateur d'un gel colloïdal dont les liaisons inter-clusters sont plus fortes que les liaisons intra-clusters (Ramaswamy, 2009, pp. 166–175; Shih et al., 1990).

I.3.1.3 Gélification par traitement enzymatique

Les enzymes sont des protéines qui engendrent ou accélèrent certaines réactions chimiques en baissant l'énergie d'activation nécessaire pour la réaction. Leur activité est dépendante du milieu (pH, force ionique, température, etc.), et comme toute protéine, elles peuvent être dénaturées, et donc par exemple inactivées par la température (Whitehurst and van Oort, 2009, pp. 7–11).

Il existe deux familles d'enzymes capables de former des liaisons protéine-protéine et aujourd'hui utilisées pour des applications agroalimentaires : les transférases (EC 2), dont la plus connue et la plus utilisée est la transglutaminase (EC 2.3.2.13), et les oxydoréductases (EC 1), telles que la peroxydase (EC 1.11.1.7), la laccase (EC 1.10.3.2) et la tyrosinase (EC 1.14.18.1) (Heck et al., 2013).

Synthétisées par des bactéries (plus de 40 espèces recensés dans la littérature), les oxydoréductases se lient à des tyrosines où à des composés phénoliques pour former des espèces réactives (radicaux libres, quinones, aldéhydes). Celles-ci peuvent ensuite former des liaisons covalentes inter-protéines, comme observé en figure 1.18.

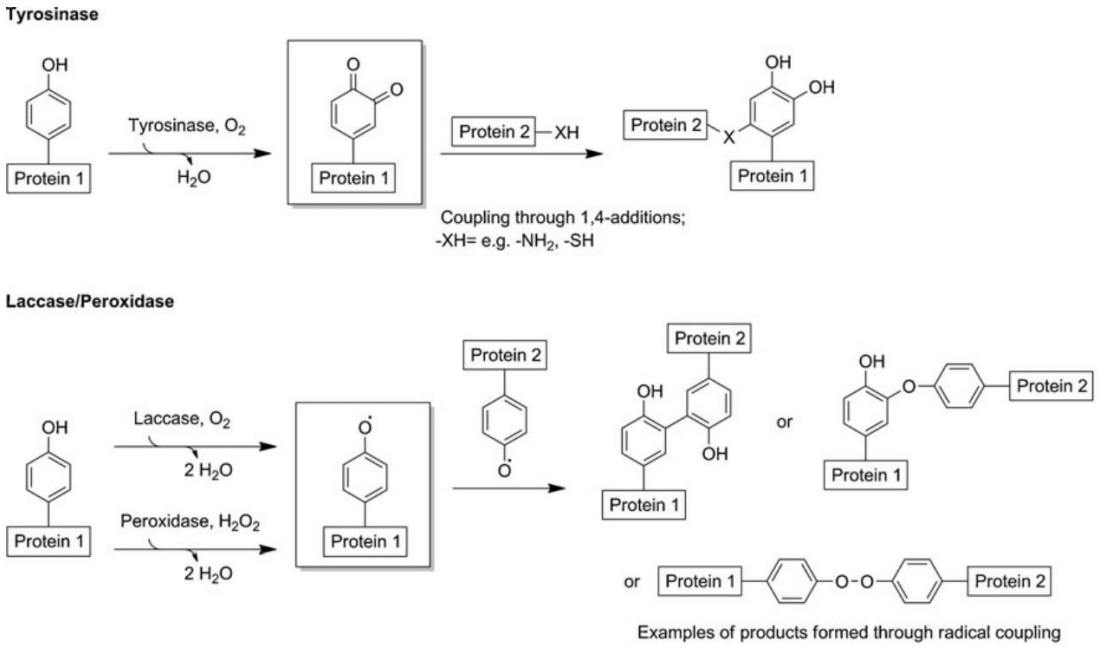


Figure I.18 : Mécanismes réactionnels de réticulation des protéines par des oxidoréductases (Heck et al., 2013).

Les transférases constituent une classe de plus de 450 enzymes capables de transférer un groupement fonctionnel (groupement amine, phosphate, alcool etc.) d'une protéine à une autre. Parmi elles, la transglutaminase est une aminotransférase (transfère un groupement amine d'une protéine à une

autre) capable de former des liaisons isopeptidiques entre la fonction amide de la glutamine et la fonction amine de la lysine ou de l'extrémité N-terminale des protéines (Kashiwagi et al., 2002). C'est une enzyme présente chez de nombreux organismes (plantes, invertébrés, mammifères, dont humain). Pour son application industrielle, la transglutaminase est obtenue par voie microbienne (mTG). Elle est en effet naturellement synthétisée par de nombreux microorganismes (dont *Streptoverticillium mobaraense*, le plus couramment utilisé, notamment en alimentaire). En plus de son faible coût, la transglutaminase microbienne présente l'avantage de ne pas nécessiter de cofacteurs, contrairement à la transglutaminase tissulaire qui requiert du Ca^{2+} pour fonctionner (Beninati and Piacentini, 2004). L'activité de la transglutaminase microbienne en fonction des conditions de pH et de température est présentée en annexe I. Les différentes réactions catalysées par la transglutaminase sont présentées en figure I.19 dans l'ordre de spécificité de l'enzyme pour chacune des réactions.

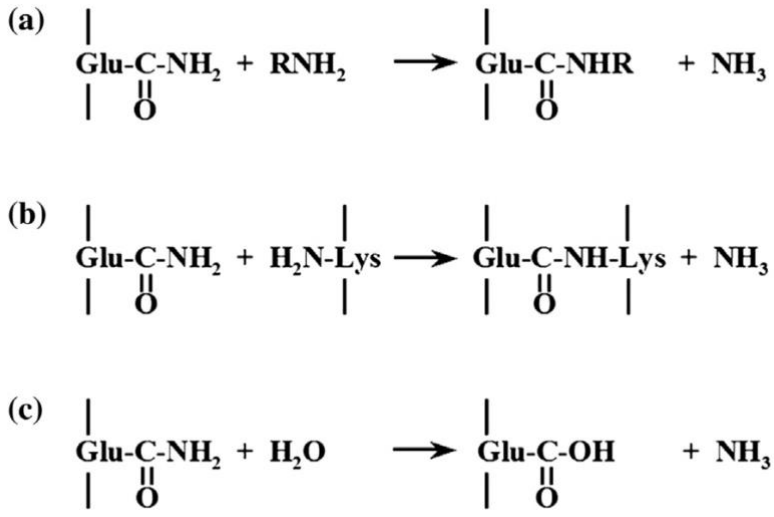


Figure I.19 : Réactions catalysées par la transglutaminase d'origine microbienne (mTG) : (a) transfert d'un groupement acyl en position N-terminale d'une protéine ; (b) formation de liaisons covalentes entre lysine et glutamine ; (c) déamidation. (Motoki and Kumazawa, 2000)

Les propriétés mécaniques des gels d'arachide formés par action de la transglutaminase diminuent au-delà d'une concentration enzyme de 0,25 mg/g (Guo et al., 2018). Certains auteurs ont montré qu'au-delà d'une certaine concentration en protéine, la force du gel formé diminue. Cette concentration a été par ailleurs mesurée à 500 µg/g de protéines pour des protéines de lait (Gauche et al., 2008).

Cette enzyme a été très largement utilisée pour améliorer les propriétés de gels issus de protéines animales (Davaatseren and Hong, 2014; Romeih and Walker, 2017; Yasumaru and Lemos, 2014) et

végétales, principalement de pois et de soja (Gan et al., 2009; Ionescu et al., 2008; Sun and Arntfield, 2012; Yang et al., 2013). La transglutaminase est considérée en France et en Europe comme un auxiliaire technologique (règlement CE 1332/2008) et son utilisation n'est donc pas indiquée sur l'étiquette du produit, dès que l'enzyme est inactivée lors du procédé de fabrication. On la retrouve plus rarement utilisée pour lier des protéines d'arachide afin d'en former des gels (Basse et al., 2018; Clare et al., 2007; Guo et al., 2018). Il a notamment pu être démontré que les conarachines étaient plus aisément agrégées par la mTG que les arachines, ce qui serait lié à leur richesse plus importante en glutamine et en lysine (Gharst, 2007).

I.3.1.4 Gélification des protéines d'arachide : bilan des travaux déjà réalisés

Un récapitulatif des travaux sur la gélification des protéines d'arachide est proposé dans le tableau I.3. On y observe que les conditions d'extraction des protéines d'arachide et les paramètres du traitement gélifiant influent particulièrement sur les propriétés gélifiantes de l'arachide. De nombreux autres travaux relatent le traitement de protéines d'arachide et étudient leur impact sur leur solubilité, leur digestibilité, leur allergénicité ou encore étudie la taille et la structure des gels formés. Nous avons ici décidé de limiter ce tableau aux travaux discutant les propriétés mécaniques des gels formés.

Concernant le traitement thermique, on observe des gels plus fermes obtenu avec les protéines extraites par précipitation isoélectrique, avec un effet augmenté pour la précipitation effectuée en condition alcoolique à 85 % d'alcool (Wu et al., 2009). On note également que le temps de traitement thermique est également essentiel, ainsi une différence d'un facteur de 200 du module élastique du gel est observée pour un traitement à 85°C pendant 20 min par rapport à un traitement à 95°C pendant 2 minutes, ce qui laisse suggérer un temps de gélification minimum (Chen et al., 2016; Jiao et al., 2018a). A noter que les deux températures utilisées (85°C et 95°C) sont au-dessus de la température de dénaturation des protéines, les deux cinétiques de montées en température sont différentes dans ces deux études, mais les cinétiques de refroidissement sont similaires, on considérera donc le temps de traitement comme le paramètre discriminant entre ces deux études pour étudier le module élastique (Sun and Arntfield, 2012)On retrouve également une fermeté plus importante pour les gels formés à partir de conarachine, en comparaison avec une même concentration d'arachine (Wang, 2017, pp. 437–447).

Tableau I.3 : Gélification de protéines d'arachide sous différentes formes par procédé thermique, acidification et traitement enzymatique par la mTG et propriétés mécaniques des gels formés

Procédé	Substrat	Concentration en substratss	Paramètres de gélification	Propriétés mécaniques	Sources
Traitement thermique	Concentrats de protéines extraits par procédés différents	12 g protéines /100 g	90°C ; 60 min puis 4°C ;14 h	Précipitation isoélectrique : 0,52 N Précipitation alcoolique : 0,46 N Précipitation isoélectrique + alcoolique : 0,56 N Extraction alcaline puis précipitation isoélectrique: 0,13 N	(Wu et al., 2009)
	Isolats de protéines	15 g/100 g	90°C ; 60 min, puis 4°C ;18 h	1,65±1 N	(Wang et al., 2014)
		15 g/100g	95°C ;2 min, puis 10°C	10 Pa sans prétraitement 30 Pa avec homogénéisation préalable (600 bar, 2 min)	(Jiao et al., 2018a)
		14 g/100 g	85°C ; 20 min, puis 25°C ; 10 min	2000 Pa	(Chen et al., 2016)
	Arachine et conarachine	8-18 g/100 g	90°C ; 30 min puis 4°C	de 0,3 N (8 g/100 g) à 2 N (18 g/100 g) pour l'arachine de 0,2 N (8 g/100 g) à 3 N (18 g/100 g) pour la conarachine	(Wang, 2017)
Traitement acidifiant	Isolat de protéines	de 14 à 22 g/100 g	95°C ; 30 min, puis 4°C puis :2g/100 g GDL à 60°C ; 40 min	de 200 Pa (14 g/100 g) à 2000 Pa (22 g/100 g)	(Bi et al., 2019; Zhu et al., 2019)
Traitement enzymatique par la transglutaminase	Broyat délipidé	25 g/100 g	0-1,25 mg mTG/g de 40°C ;2h puis à 95°C ; 5 min, puis 115°C-0,17 MPa ;t 20 min, et pressé en 3 étapes (23,9 g/cm^2-30 min, 47,8 g/cm^2-30min, et 71,6 g/cm^2-4h)	de 1,2 N (contrôle sans mTG et 1,25 mg mTG/g de broyat) à 4,5 N (0,25 mg mTG/g de broyat)	(Guo et al., 2018)

Les propriétés mécaniques des gels étudiées sont le pic de force mesuré à la compression (en rouge) et le module de conservation mesurée en rhéologie (en violet). La concentration en protéines des isolats est de 90±1 g/100.

I.3.1.4 Théorie fractale et gélification des protéines

Il a été montré que dans certains cas, les réseaux de protéines formés au cours d'un procédé de gélification pouvaient présenter une structure fractale (Barrett and Peleg, 1995; Hagiwara et al., 1997). Ils s'apparentent donc à des gels colloïdaux, formés par agrégation progressive de particules colloïdales, dans des conditions où leur potentiel d'interaction est de nature attractive. Ainsi, lors de la percolation des agrégats en un réseau continue, chaque agrégat conserve sa structure fractale (Shih et al., 1989). La théorie fractale a été développée par Benoît Mandelbrot en 1977. Il s'agit d'un concept géométrique permettant de décrire une structure qui apparaît similaire, quelle que soit l'échelle d'observation. Il est alors possible de caractériser une telle structure en utilisant la dimension fractale D_f. De même qu'un carré peut être divisé en n^2 carrés identiques, une structure fractale peut être divisé en n^{Df} structures identiques (Ikeda and Zhong, 2012; Mandelbrot, 1977). Shih et.al (1990) ont développé une relation liant la dimension fractale d'un gel à l'évolution du module de conservation du gel, G' ou de sa limite de linéarité LVE, en fonction de la fraction volumique en particule ϕ (dans le cas qui nous intéresse, en protéines):

$$G' \sim \phi^{(x+d_f)/(x-D_f)} \quad (2)$$

$$LVE \sim \phi^{(1+d_f)/(x-D_f)} \quad (3)$$

avec x la dimension Euclidienne du système (x = 3 pour une structure tri-dimensionelle) ; d_f la dimension fractale de la charpente de la structure élastique (valeur généralement comprise entre 1,1 et 1,3) ; D_f la dimension fractale des agrégats constitutifs du gel (Shih et al., 1990).

Il est également possible de mesurer la dimension fractale avec des images prises en microscopie *via* la technique de « box-counting ». Pour cela, on impose un maillage carré de taille L par-dessus l'image du réseau de polymères et compte le nombre de mailles N(L) dans lesquels on observe le réseau de polymères. On peut alors déterminée la dimension fractale des agrégats de polymères dans l'image 2D à partir de la pente de la courbe logarithmique de N(L) en fonction de L, sachant que :

$$N(L) \sim L^D \quad (4)$$

La dimension fractale des agrégats dans le réseau 3D est enfin calculée par l'équation suivante :

$$D_f = D + 1 \quad (5)$$

Les gels de protéines formés par traitement thermique sont susceptibles de posséder une structure fractale (Pouzot et al., 2004a, 2004b), de même que les gels acides (Alting et al., 2003; Bi et al., 2019) et enzymatiques (Sariçay, 2014). Ces dimensions fractales sont théoriquement comprises entre 1,7 et 2,1 ; on peut observer des mesures expérimentales de dimensions fractales jusqu'à 2,5 (Lin et al., 1990), elles sont calculés pour des valeurs proches de 2 dans les articles cités plus haut, indépendamment du procédé de gélification (Eissa and Khan, 2005). La valeur de la dimension fractale est reliée au régime d'agrégation des clusters colloïdaux, qui peut être limitée par la réaction à l'origine de l'agrégation (Reaction-Limited Cluster Aggregation, RLCA, pour une dimension fractale théorique de 2,1) ; ou limitée par la diffusion dans le milieu et la probabilité de leur rencontre (Diffusion-Limited Cluster Aggregation, DLCA, pour une dimension fractale théorique de 1,7). Les clusters au sein des gels formés par RLCA sont généralement plus polydisperse et forme un réseau plus dense que ceux des gels formés par DLCA (Lin et al., 1990; Pouzot et al., 2004b)

I.3.2 Impact d'une phase dispersée lors de la gélification d'une solution de protéines

De nombreux produits alimentaires sont caractérisés par une structure hétérogène. Ainsi, une matrice gélifiée peu enserrer une phase dispersée qui pouvant influencer les propriétés mécaniques du gel formé. Il peut s'agir par exemple de gouttelettes lipidiques (possiblement stabilisées par les protéines de la phase continue), de particules solides de dureté plus ou moins importante, ou de polyoses initialement insolubles tels que l'amidon, qui peut former un second réseau lors d'un traitement thermique (Ramaswamy, 2009). En effet, le granule d'amidon gélatinise à une température d'environ 70°C, de l'amylose et de l'amylopectine sont alors libérées dans l'eau puis peuvent former un gel au refroidissement (Ai and Jane, 2015). Nous nous intéresserons dans ce paragraphe à l'effet de l'introduction de gouttelettes d'huile.

Dans une émulsion huile dans eau riche en protéines solubilisées dans la phase continue, une fraction de ces protéines peut s'adsorber à l'interface et assurer la stabilité de l'émulsion. Lorsqu'on applique un traitement conduisant à la gélification des protéines, la phase aqueuse continue dans laquelle les protéines sont solubilisées va passer à l'état de gel, formant ce que l'on appelle une émulsion gélifiée (Lam and Nickerson, 2013; McClements, 2015). Lorsque la phase dispersée lipidique est en interaction avec les protéines du réseau, la force de ce gel est toujours supérieure à celle d'un gel de protéines équivalent (mêmes protéines à la même concentration). Cette phase dispersée lipidique

apporte alors un effet de renforcement du réseau du gel (Dickinson, 2012; McClements et al., 1993). L'intensité de ce renforcement dépend de plusieurs facteurs tels que l'hétérogénéité de la distribution spatiale et la nature et la force de l'interaction à l'interface.

Outre ces facteurs, il existe deux autres facteurs majeurs qui vont impacter le niveau de renfort des particules sur le gel de protéines : la fraction volumique des particules/gouttelettes et leur taille.

Concernant l'impact de la fraction volumique en particules sur le renforcement du gel, de nombreux modèles permettent de mesurer cet effet. La majorité de ces modèles sont dérivés de la relation d'Einstein sur la viscosité d'une suspension diluée contenant des sphères rigides, uniformes et monodisperses. On considère un maximum de fraction volumique, appelé Random Close Packing (RCP), au-delà duquel les particules sont en contacts les unes avec les autres et ne sont plus dispersées dans le milieu. La valeur du RCP est prise à 0,64 pour des sphères monodisperses et 0,64<RCP<1 pour des particules non sphériques et/ou polydisperses (Bernal and Finney, 1967; van Aken et al., 2015). Ce seuil maximum est connu sous le nom de Random Close Packing (RCP). Pour des particules sphériques et monodisperses, sa valeur est $\phi_{rcp} = 0{,}64$. Au-delà de cette valeur, l'ensemble des particules de la phase dispersée est en contact permanent et, dans le cas de gouttelettes liquides, se déforme (Manski et al., 2007).

Eilers fut le premier à dériver la relation d'Einstein afin d'étudier non plus la viscosité, mais le module des gels en fonction de la fraction volumique en particules. Son modèle permet de relier le module de cisaillement complexe G^* d'un gel à celui de la phase continue gélifiée seule et à la fraction volumique en particules (toujours dans le cas de sphères rigides, uniformes et monodisperses (Eilers, 1941; Manski et al., 2007):

$$G^* = G_m^* \times \frac{1{,}25 \times \phi}{1 - {\phi}/{\phi_{RCP}}} \qquad (6)$$

avec G^* le module complexe (rapport de la contrainte sur la déformation) du gel formé par la phase continue et les particules ; G^*_m le module complexe du gel formé par la phase continue seule ; Φ la fraction volumique en particules et Φ_{RCP} la fraction volumique au RCP (RCP=0,64).

Ces travaux ont par la suite été développés par van der Poel dont le modèle est encore utilisé aujourd'hui et permet de prendre en compte la rigidité des particules vis-à-vis de la matrice gélifiée. Sa forme développée se présente ainsi (van der Poel, 1958):

$$\frac{G'}{G'_m} = \frac{15 \times (1 - \upsilon_m)(\frac{G'_f}{G'_m} - 1)\phi_f}{(8 - 10\upsilon_m)\frac{G'_f}{G'_m} + 7 - 5\upsilon_m - (8 - 10\upsilon_m)(\frac{G'_f}{G'_m} - 1)\phi_f} + 1 \qquad (7)$$

avec G' le module de conservation de la matrice gélifiée avec les particules ; G'_f le module des particules seules ; G'_m le module de la matrice gélifiée seule ; ϕ_f la fraction volumique de particule et υ_m le ratio de Poisson de la matrice gélifiée.

Une version simplifiée ne prenant pas en compte le ratio de Poisson de la matrice a également été développée :

$$\frac{G'}{G'_m} = (\frac{1}{(1 - \phi)})^{2,5} \qquad (8)$$

Les limites de ces modèles ont par la suite été mises en lumière par van Vliet, qui a démontré que le niveau d'interaction entre la matrice et les particules pouvait être variable et essentiel pour la bonne modélisation du renforcement du gel (van Vliet, 1988). Il a pu démontrer cela en comparant des gels de protéines laitières et de polymères synthétiques (alcool polyvinylique - Congo rouge, PVA-CR) contenant des particules susceptibles d'interagir fortement avec la matrice (soit des gouttelettes de matière grasse laitière anhydre stabilisée par des caséines , soit des gouttelettes d'huile de paraffine stabilisées par du PVA), ou au contraire ne devant pas interagir avec la matrice (des globules gras natifs issus de crème lavée pour éliminer les protéines de la phase continue). Ses résultats sont présentés en figure I.20. L'effet de renforcement est bien plus important lorsqu'il y a une forte interaction entre les particules et la matrice (ronds pleins) que lorsqu'il y a une faible interaction avec la matrice (carrés pleins). A l'inverse, en absence d'interactions (symboles vides), les globules gras natifs ne renforcent pas la matrice mais au contraire diminue son module.

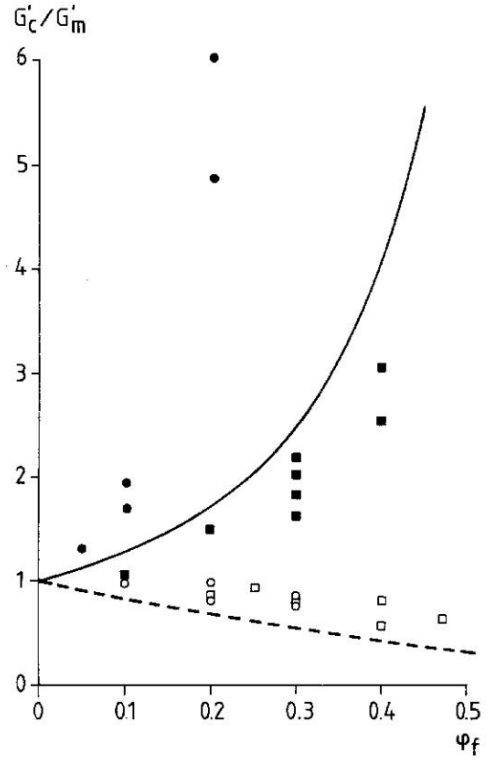


Figure I.20 : Ratio du module de conservation d'une émulsion gélifiée sur le module de la matrice seule, en fonction de la fraction volumique en particules dispersées. Les carrés représentent des gels de PVA et les cercles des gels de caséines laitières formés par acidification. Les symboles pleins contiennent une phase dispersée susceptible d'interagir avec le réseau et les symboles vides une phase dispersée lipidique non susceptible d'interagir avec le réseau. Courbe continue : théorie de van der Poel (équation 6) pour des particules dispersées plus rigides que la matrice ($G'_f > G'_m$) ; Courbe pointillée : même théorie pour $G'_f = 0$. Source : (van Vliet, 1988)

Suite à ces travaux, de nombreuses variantes ont été développées et permettent aujourd'hui de prendre en compte d'autres paramètres : le ratio de Poisson de la phase continue, les forces d'interactions à l'interface entre les protéines et les particules, le diamètre de Sauter moyen d'une particule, etc. (Dickinson, 2012; Pons et al., 1993; van Aken et al., 2015). D'autres auteurs ont par la suite complexifié ce modèle en proposant des facteurs d'encombrement des particules, ou des facteurs de rigidité des particules. On entend ici par « facteur » des constantes propres à un système (Clark et al., 2001; Dickinson, 2012; Manski et al., 2007; van der Poel, 1958).

La force du gel obtenu augmente lorsque la taille des particules diminue. Ce renforcement s'explique par deux phénomènes : des particules plus petites peuvent davantage s'intégrer dans le réseau et ainsi agir en tant que points de jonction. Elles ont également une surface totale plus importante, et cette plus grande surface permet un plus grand nombre d'interactions entre les particules et le réseau. Des particules de tailles trop grandes (entre 10 et 100 µm) peuvent à l'inverse avoir un effet de fragilisation du gel (Kim et al., 2001; McClements et al., 1993; van Vliet et al., 1991).

A l'inverse du module, le seuil d'écoulement à la déformation des gels diminue lorsque la fraction volumique en particules augmente lorsque celles-ci sont liées au réseau protéique (Manski et al., 2007). Dans le cas de particules non intégrées au réseau, leur fraction volumique ne semble pas avoir d'impact sur la déformation à la rupture des gels (Liu et al., 2014; Rosa et al., 2006).

Cet effet similaire de l'impact des particules sur les propriétés mécaniques a également été démontré avec un module d'élasticité (module de Young) qui augmente avec la fraction volumique en particule et qui, pour une même fraction volumique, diminue avec la taille des particules lorsque celles-ci sont en intégrées au réseau. De même, le taux de déformation du gel à la rupture en compression diminue lorsque la fraction volumique en particules augmente et lorsque leur taille diminue, dans le cas où les particules sont intégrées dans le réseau. Lorsque les particules ne sont pas en interaction avec la matrice gélifiée, leur fraction volumique et leur taille n'ont pas d'effet sur le taux de déformation à la rupture de la matrice gélifiée (qui est alors égal au taux de la matrice gélifiée sans particule). Le module de Young diminue avec l'augmentation de la fraction volumique en particules non liées, mais leur taille ne semble pas avoir d'effet sur le module (Fuhrmann et al., 2020; Sala et al., 2009b, 2009a, 2007).

I.3.3 Gélification de matrices protéiques contenant des polyoses

La présence de polyoses est susceptible de modifier les propriétés d'un gel de protéines (Ghosh and Bandyopadhyay, 2012). Ces polyoses peuvent être solubles (gomme arabique, gomme de xanthane, pectines) ou insolubles dans l'eau à froid (amidon, fibres insolubles). Dans un système ou les protéines et les polysaccharides sont solubles, trois cas de figures peuvent être rencontrés, la co-solubilité, la séparation de phase par incompatibilité thermodynamique et la coacervation sous forme de complexes protéines-polyoses.

Les complexes protéines-polyoses se forment par interactions électrostatiques, lorsque les polyoses et les protéines portent des charges opposées. Les complexes peuvent être solubles, lorsque le nombre de charges portées par les protéines est différent du nombre de charges opposées portées par les polyoses ; ou insolubles, lorsque la charge nette du complexe est proche de zéro (Le et al., 2017).

La co-solubilité survient lorsque l'entropie du mélange protéines-polyoses (associée à l'affinité de chaque composant pour le milieu) est supérieure à son enthalpie (associée aux interactions entre les constituants). En raison des groupements fonctionnels variés présents dans les protéines et les

polyoses, susceptibles d'engendrer des interactions électroniques protéines-polyoses, la co-solubilité est la situation la plus rarement rencontrée dans les systèmes alimentaires.

A l'inverse de la co-solubilité, l'incompatibilité thermodynamique intervient lorsque l'enthalpie du mélange est supérieure à son entropie, ou lorsque les affinités respectives des protéines et des polyoses pour le solvant sont trop différentes. Il y a alors séparation de phase à l'échelle microscopique ou macroscopique.

Les interactions des polyoses en solution avec les protéines dépendent donc de leur solubilité respective et de leur différence d'affinité pour le solvant Ainsi, il est possible de moduler ces interactions via le ratio protéines/polyoses, la masse molaire et la concentration molaire de chaque élément, la conformation des protéines (natives, dénaturées, agrégées), le pH, et la force ionique (Turgeon and Laneuville, 2009).

Ces mélanges peuvent ensuite subir des traitements acidifiants, thermiques ou encore enzymatique afin de former des gels. Selon le nature de la phase gélifiée (protéines, polyoses ou les deux) et la présence d'interactions ou non entre les protéines et les polyoses, on peut définir huit cas de figures (voir figure I.21). Ces huit cas de figures peuvent être regroupés en trois types de réseaux gélifiés: les gels interpénétrés, les gels à séparation de phase, et les gels mixtes (Le et al., 2017).

Les gels interpénétrés (figure I.21 A) sont obtenus lorsque les protéines et les polyoses sont gélifiés simultanément et que les deux réseaux coexistent dans le matériau (Karak, 2012).

Les gels à séparation de phase (figure I.21 B) sont produits lorsque les deux phases (protéines et polyoses) présentent des interactions électrostatiques répulsives entre elles. Il y a alors compétition entre le phénomène de séparation de phase et celui de gélification qui va figer le système (protéine-protéine et polyose-polyose). L'étendue de la séparation de phase est modulée par les conditions physico-chimiques de la solution (force ionique, pH, cinétique de gélification. En effet, une cinétique de gélification plus lente permet une séparation de phase plus importante (phases plus concentrées, respectivement en polyoses et en protéines), tandis qu'une cinétique rapide diminue cet effet. Ces conditions vont également être décisives pour déterminer quelle phase va gélifier en premier (Çakir et al., 2012; Croguennoc et al., 2001; Turgeon and Laneuville, 2009).

Enfin, les gels mixtes (figure I.21 C) sont formés lorsque les deux phases présentent des interactions électrostatiques attractives entre elles et qu'elles s'entremêlent alors pendant la gélification (Laneuville et al., 2006; Yang, 2016).

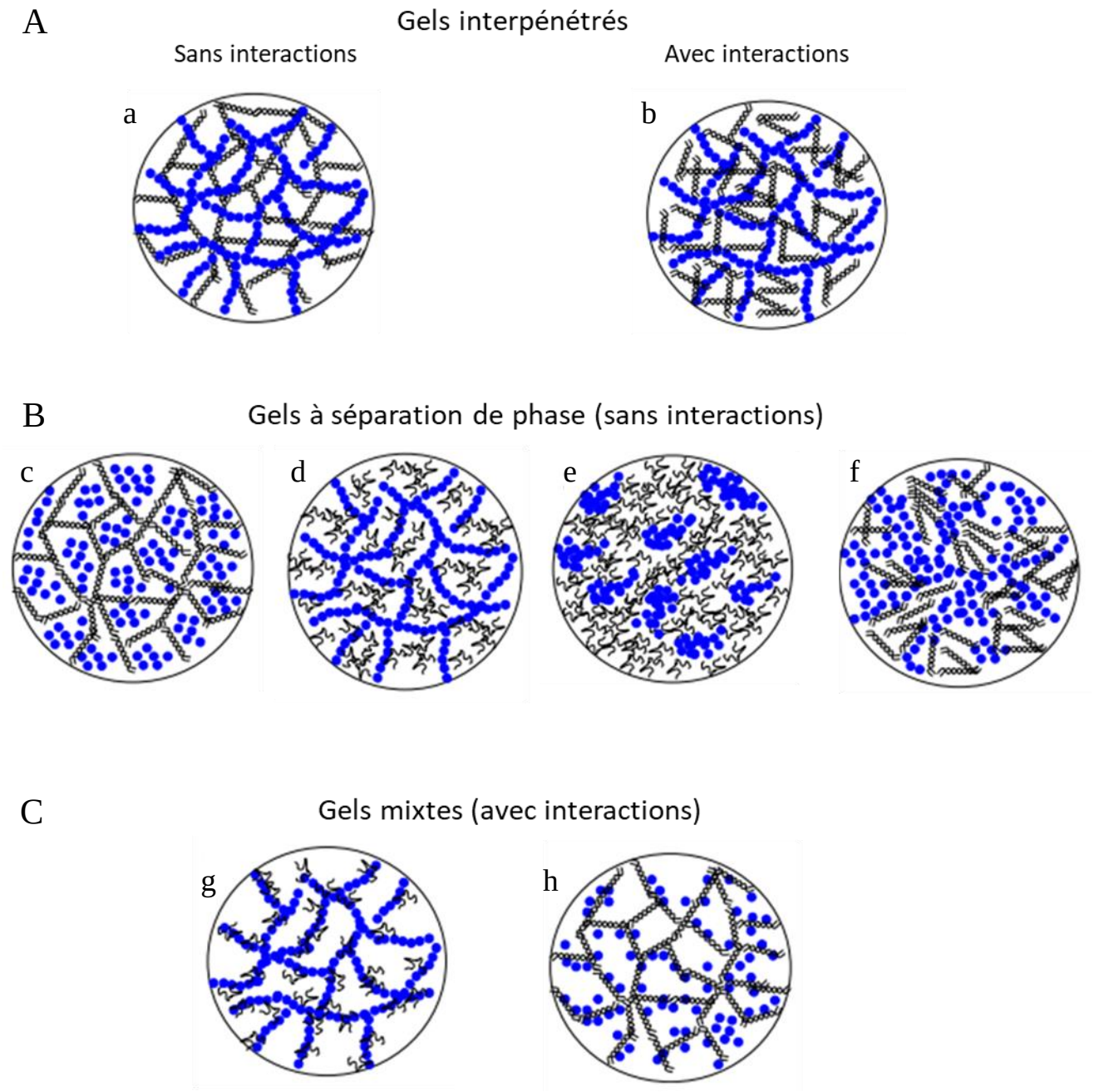


Figure I.21 Schémas des différentes structures formées par gélification d'un mélange de protéines (en bleu) et de polyoses (en noir). (A) Gel interpénétré a) formé par un réseau protéique et un réseau de polyoses sans interactions entre eux et b) formé par un réseau protéique et un réseau de polyoses avec présence d'interactions électrostatiques entre les deux réseaux. B) Gel à séparation de phase formé c) par un réseau de polyose avec des agrégats protéiques qui remplissent l'espace entre les branchements ; d) par un réseau de protéines avec des agrégats de polyoses qui remplissent l'espace entre les branchements ; e) microgels de protéines dispersés dans un réseau de polyoses enchevêtrés ; f) microgels de polyoses dispersés dans un réseau de protéines floculées. C) Gel mixte g) formé par des polyoses en interaction avec un réseau de protéines gélifiées et h) formé par des protéines en interaction avec un réseau de polyoses gélifiés. D'après (Le et al., 2017)

Le ratio protéine/polysaccharide est le paramètre le plus important afin de déterminer la structure et les propriétés rhéologiques d'un gel formé à partir d'un mélange de protéines et de polyoses. Ainsi,

pour chaque couple protéine-polyose en solution, il existe un ratio optimal pour lequel les interactions électrostatiques atteignent un équilibre entre force attractives et répulsives, ce qui permet la formation d'un gel de force et de vitesse de gélification maximales, supérieure à celle du gel de protéines seules et de polyoses seuls (Le et al., 2017). Lors de la formation d'un gel par un réseau mixtes protéines-polyoses, les interactions électrostatiques sont les principales forces responsables de la formation du gel, le gel est donc pH-réversible. De même, l'augmentation de la force ionique peut retarder la formation du gel, voir empêcher la gélification et induire la formation de complexes qui vont alors précipiter. Ainsi, l'ajout de 20 mM de NaCl divise par 3 la vitesse de gélification dG'/dpH d'un gel formé par acidification d'un mélange de β-lactoglobuline et de gomme de xanthane (ratio de protéines:polyoses à 5:1). L'ajout de 50 mM de NaCl, empêche la formation du gel (Le et al., 2017). Cela s'explique par un écrantage des charges qui induit alors une agrégation protéine-protéine et polyose-polyose et résultant en une séparation des phases. La température joue également un rôle sur cet équilibre agrégation/répulsion lorsqu'elle entraîne la dénaturation des protéines. Il a été démontré qu'un mélange de β-lactoglobuline et de κ-carraghénane (ratio 6,7:1) chauffé à 70°C présente une séparation de phase tandis qu'un gel se forme en chauffant à 76°C (Croguennoc et al., 2001). L'auteur note également que la structure fractale du gel de protéines seules est conservée lors de la gélification du mélange protéines-polyoses.

Dans les bonnes conditions favorisant les interactions protéines-polyoses, l'ajout de polyose améliore également les propriétés d'un gel de protéines formé par traitement enzymatique avec la transglutaminase. Par exemple, une étude des propriétés mécaniques d'un mélange d'isolat de protéines de lait (10 g/100 g) et de gomme de caroube a démontré que l'ajout de 0,1 g/100 g de gomme de caroube permet d'obtenir un module de conservation sept fois plus important (1400 Pa) et un taux de déformation à la rupture 1,4 fois plus faible que celui du gel formé à partir des protéines seules dans les mêmes conditions. Des concentrations supérieures en caroube augmentent le taux de déformation à la rupture et diminuent le module de conservation, jusqu'à atteindre 100 Pa à 0,8 g/100 g de gomme. L'analyse de la microstructure des gels a démontré que cela était dû à une séparation de phase, conduisant à la formation de clusters de protéines de plus en plus larges et polydisperses dans la phase concentrée en protéines, et ainsi réduisant l'efficacité de la gélification (Rocha et al., 2009).

Dans certains, cas, les polyoses présentent des fonctions amines, c'est le cas par exemple du chitosan. Ainsi, un gel formé par traitement à la transglutaminase, à partir d'un mélange de gélatines et de chitosan, présente un module élastique dix fois plus important qu'un gel formé par de la gélatine seule dans les mêmes conditions. Le module élastique de ce gel augmente, comme attendu, avec la

concentration en gélatine, ainsi qu'avec la concentration en chitosane, de 0,1 % à 0,5 % (Chen et al., 2003).

La littérature fait également mention de mélanges de protéines d'arachides et de polyoses, issus de l'arachide ou du commerce (Chen et al., 2016; Jiao et al., 2018a). Le module élastique d'un gel obtenu par traitement thermique (95°C, 2 min), d'un isolat de protéines d'arachides (15 g/100 g) augmente de 10 Pa pour les protéines seules, à 50 Pa en présence de 0,1 g/100 g de chitosan, à 200 Pa lorsqu'il contient 0,1 g/100 g de gomme de guar et 500 Pa lorsqu'il contient 0,1 g/100 g de gomme de xanthane (Jiao et al., 2018a).

I.3.4 Propriétés interfaciales des protéines

Les protéines ont la propriété de s'adsorber aux interfaces, notamment les interfaces air/eau (A/E) et huile/eau (H/E). Elles peuvent ainsi contribuer à la stabilisation de bulles d'air ou de gouttelettes lipidiques en milieu aqueux. Cette adsorption est permise par le caractère amphiphile des protéines. Il a été montré que lors de leur adsorption à l'interface H/E, leur structure tertiaire se réorganisait de façon à exposer les acides aminés hydrophobes du côté de la phase lipidique, au niveau de l'interface (figure I.20) (Lam and Nickerson, 2013; Mitropoulos et al., 2014). L'adsorption est un phénomène spontané, associé à un gain d'entropie suite au changement de conformation des protéines qui se déplient. Cette perte de structure secondaire ou tertiaire leur confère une plus grande flexibilité conformationnelle lors de leur adsorption à la surface de la phase lipophile ainsi qu' un gain d'enthalpie résultant de la déshydratation de zones hydrophobes à la surface des protéines natives lorsque ces dernières s'adsorbent (Mezzenga and Fischer, 2013).

L'adsorption se produit en deux étapes (figure I.22) : 1) diffusion des protéines du milieu vers l'interface, 2) adsorption à l'interface H/E. À la suite de l'adsorption, l'émulsion est stabilisée par diminution de la tension interfaciale. L'adsorption de protéines modifie ainsi les possibilités et cinétiques d'adsorption ultérieures d'autres protéines par répulsion électrostatique. Les répulsions électrostatiques entre gouttelettes dues à la présence de protéines augmentent la stabilité de l'émulsion.

L'adsorption des protéines à l'interface peut être suivie en mesurant l'évolution de la tension de surface, plusieurs heures pouvant être nécessaires pour atteindre l'équilibre, c'est-à-dire une tension de surface constante.

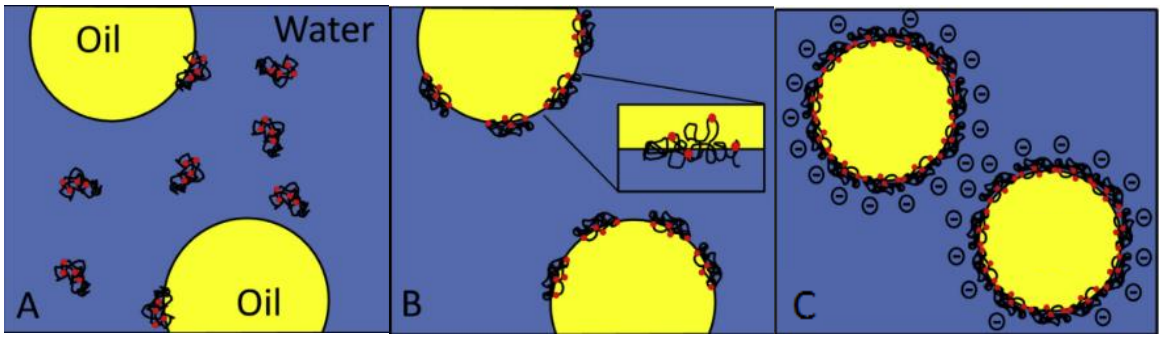


Figure I.22 : Représentation schématique du phénomène d'adsorption de protéines en surface de gouttelettes lipidiques dans un milieu aqueux, en trois étapes : diffusion de protéines d'un milieu aqueux vers une interface lipidique (A), adsorption des protéines en surface des particules lipidiques (B), stabilisation de l'émulsion (C). En rouge, les fractions hydrophobes des protéines. D'après Lam and Nickerson, 2013

L'équilibre dynamique de l'adsorption dépend des propriétés intrinsèques des molécules en présence - polarité des phases (Beverung et al., 1999; Zhai et al., 2011), structure et stabilité des protéines (Lad et al., 2006; Mac Ritchie, 1998; Nylander, 1998) – mais aussi des paramètres environnementaux - température, pression, pH et force ionique.

L'impact de la température est double. Lorsque la température augmente, le coefficient de diffusion des protéines dans le milieu augmente lui aussi. En outre, si la température excède la température de dénaturation (propre à chaque protéine), les protéines changent de conformation avant de s'adsorber à l'interface. La conjugaison des deux effets se traduit par une cinétique d'adsorption plus rapide lorsque la température augmente (Surel et al., 2014).

En phase aqueuse, les protéines chargées peuvent interagir par des interactions électrostatiques, qui peuvent être de nature répulsive (entre charges similaires) ou attractive (entre charges opposées). La force ionique du milieu contrôle notamment la portée de ces interactions, par un effet d'écrantage des charges. La force ionique permet donc de moduler la cinétique d'adsorption des protéines à l'interface, puis la stabilité de l'émulsion, qui dépend (entre autres) des répulsions électrostatiques entre gouttelettes dont la surface est couverte de protéines chargées (Blijdenstein et al., 2003; Tornberg and Hermansson, 1977).

Comparativement à des protéines de lait, de riz et de soja, les protéines de l'arachide présentent de bonnes propriétés tensioactives. Dans des conditions similaires d'émulsification (huile de maïs, concentration en protéine comprise entre 1 et 10, p/v), les gouttelettes formées en présence de protéines d'arachide sont plus petites (<300 nm, contre 400 nm avec des protéines de lait et de soja, et jusqu'à 500 nm pour des protéines de riz), mais également plus stables (Li et al., 2019). Dans ces

systèmes, la tension de surface est abaissée : 11,5 mN/m par les protéines d'arachide, contre 12 à 15 mN/m avec les autres protéines étudiées.

En outre, au sein des protéines d'arachide, les différents groupes de protéines possèdent différentes propriétés interfaciales. Il a notamment été montré après émulsification d'huile d'arachide par ces différents groupes de protéines, extraites à partir de protéines solubles et de protéines stabilisant les sphérosomes, que la tension interfaciale, l'index d'activité émulsifiante et l'index de stabilité émulsifiante étaient positivement corrélés avec le contenu en ponts disulfures et l'hydrophobicité de surface des protéines (Zhang and Lu, 2015).

Chapitre II : Stratégie de recherche

Lors du broyage de graines d'arachide, on obtient une pâte grasse et granuleuse qui, mélangée avec de l'eau, produit une suspension liquide instable, appelée mix dans ce travail. Ce liquide contient donc l'intégralité des constituants de la graine en suspension (protéines, glucides, acides gras sous forme de gouttelettes, etc.). Des phénomènes de sédimentation et de crémage surviennent au bout de plusieurs heures à température ambiante. Au cours d'une étude préliminaire, la société Onyx Développement a montré la capacité de cette suspension à gélifier grâce à l'application d'un traitement enzymatique à la transglutaminase microbienne, et a mis en évidence le rôle de la force ionique du milieu dans la force des gels obtenus (mesurées par pénétrométrie) (Basse et al., 2018). L'effet observé de la transglutaminase suggère que la gélification est liée à la formation d'un réseau protéique, la graine d'arachide en contenant environ 26 g/100g. Ces protéines, en particulier les deux familles de globulines principales du protéome (arachines et conarachines), peuvent former des gels selon divers processus : par des traitements thermiques, par des traitements enzymatiques et par acidification. Une meilleure compréhension des phénomènes de gélification induits par un traitement enzymatique ou par d'autres voies - thermique ou acide - et l'identification du rôle de chacun des constituants dispersés dans ces suspensions complexes (protéines, corps lipidiques, grains d'amidon, etc.) permettraient de concevoir et développer de manière raisonnée de nouveaux produits à base d'arachide, sans fractionnement préalable. L'intégralité de l'apport nutritionnel de la graine d'arachide pourrait ainsi être conservée.

Plusieurs questions de recherche ont été identifiées. Pour chacune d'elles, une ou plusieurs hypothèse(s) ont été proposée(s) et ont guidé ce travail.

1/ Comment se répartissent les différents constituants de la graine d'arachide dans les fractions composants le mix et quelle est la capacité gélifiante de cette suspension ? Quel est l'impact de la force ionique sur cette répartition et sur les propriétés rhéologiques de la suspension gélifiée ? (Chapitre IV)

- *Hypothèse 1. Le broyage en milieu aqueux libère les différents composants cellulaires. On devrait ainsi retrouver dans le mix une phase aqueuse contenant des constituants solubles (notamment des protéines et des sucres), des sphérosomes, des granules d'amidon et des débris cellulaires insolubles.*

Cette hypothèse pourra être vérifiée par l'étude par microscopie de la structure et de l'organisation des différents éléments qui composent la suspension et par la quantification des protéines et des lipides. La solubilité des protéines étant dépendante de la force ionique, celle-ci sera ajustée à deux niveaux par du NaCl (0,5 et 0,8 mol/L) pour essayer de moduler les teneurs en protéines extraites mais également la composition de l'extrait protéique soluble. La suspension sera ensuite fractionnée

par centrifugation pour pouvoir extraire et caractériser indépendamment les différentes phases présentes dans le mix. Au cours de la centrifugation, on s'attend à ce que les sphérosomes, moins denses que l'eau, remontent en surface, à ce que les particules denses tombent au fond et forment un culot, et à ce qu'une phase intermédiaire aqueuse contenant les molécules solubles (notamment les protéines) puisse être récupérée entre le surnageant et le culot.

- *Hypothèse 2. La phase aqueuse de cette suspension contient des protéines solubles, lesquelles sont vraisemblablement à l'origine du phénomène de gélification. Il devrait donc être possible de former des gels à partir de la suspension en utilisant différents types de traitements permettant la gélification des protéines : un traitement thermique, un traitement acidifiant et un traitement enzymatique.*

  Ces différents procédés de gélification vont donc être utilisés et les gels formés comparés (propriétés rhéologiques, microstructure) afin de pouvoir sélectionner pour la suite du travail, le ou les procédé(s) les plus intéressant(s), sur la base des propriétés mécaniques des gels obtenus, mais aussi en vue d'une application industrielle.

2/ Quel est l'impact du procédé de gélification et de la force ionique sur les propriétés d'un gel de protéine d'arachide ? (Chapitre V)

- *Hypothèse : Les protéines solubles sont à l'origine de la gélification de la suspension. La solubilité des protéines dépend de la force ionique. Il est donc possible de contrôler certaines propriétés mécaniques des gels obtenus en modulant la force ionique.*

  Les protéines solubles seront extraites de la suspension obtenue en présence de NaCl à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L. Elles seront identifiées par électrophorèse et leurs propriétés physico-chimiques (indice d'hydrophobicité, concentration en groupements thiols) seront comparées dans les deux conditions, pour mettre en évidence un effet de la force ionique sur la composition et les propriétés de l'extrait protéique. Dans un second temps, ces extraits protéiques seront gélifiés pour étudier l'effet de la composition en protéines sur les propriétés du gel. Pour distinguer cet effet de l'effet de la force ionique sur les interactions protéines-protéines, des gels seront préparés aux différentes fortes ioniques, pour chacun des extraits. L'impact des différents procédés de gélification utilisés sera également étudié, et le lien sera fait entre les propriétés des gels et l'interdépendance possible entre composition des extraits protéiques et procédé de gélification. Les propriétés et structures des gels seront caractérisées respectivement par rhéologie et par microscopie confocale.

3/ Quel est le rôle des corps lipidiques (oléosomes) et des constituants insolubles dans les propriétés structurales et rhéologiques du gel ? (chapitre VI)

- *Hypothèse : Lors de la gélification du mix, la fraction lipidique et la fraction insoluble retrouvée dans le culot sont insérées dans une matrice protéique gélifiée. Chacune de ces fractions est capable d'interagir avec cette matrice et ainsi d'en renforcer la structure et d'en modifier les propriétés.*

  Des gels seront donc formés à partir de solutions de protéines solubles, auxquelles seront ajoutés différentes fractions volumiques des phases lipidiques et insolubles (culot). L'effet de chacune de ces phases sur les propriétés rhéologiques des gels formés ainsi que sur leur microstructure sera étudiée. Les résultats seront confrontés à des modèles décrivant les propriétés de systèmes dispersés dans lesquels la phase continue est gélifiée, afin de déterminer l'effet de ces phases dispersées sur les propriétés des gels et de montrer un éventuel effet renfort.

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.2 Matières premières et réactifs

L'arachide utilisée dans le cadre de ce projet de recherche est fournie par Bredabest (Pays-Bas). De variété Runner High Oleic (HO), c'est-à-dire à haute teneur en acide oléique, elle est issue d'une même récolte, d'origine argentine. Elle est décortiquée, blanchie et conservée à 4°C en sacs opaques de 20 kg sous vide. Des mesures de l'indice de peroxyde (indicateur du niveau d'oxydation de l'huile) et de la composition en macro- et micro-nutriments (acides aminés, minéraux, vitamines, acides gras) ont été effectuées afin de confirmer que les graines stockées n'évoluaient pas au cours du stockage. Ces mesures ont été externalisées.

L'eau distillée est obtenue par un système de purification Milli-Q développé par Millipore (Merck, Allemagne). Sa conductivité est de 0,001 mS/cm. A titre de comparaison, l'eau courante, également utilisée dans cette étude, possède une conductivité de 0,58 mS/cm.

Le sel utilisé est du sel de mer fin La Baleine (France). Il contient, outre du chlorure de sodium (NaCl), 250 mg/kg de fluorure de potassium, 15 à 20 mg/kg d'iodure de sodium et des antiagglomérants (oxyde de magnésium E530 et ferrocyanure de sodium E535). Pour simplifier, on considèrera ici que un gramme de sel correspond à un gramme de NaCl.

La transglutaminase (E.C.2.3.2.13) utilisée est une enzyme d'origine microbienne, Activa EB, commercialisée par Ajinomoto (Japon). L'enzyme se présente sous la forme d'une poudre blanche et contient 0,5 % en masse d'enzyme active dans une matrice de maltodextrine et de caséinates de sodium. L'activité de l'enzyme est indiquée à ≥ 34 U/g. Afin de conserver au mieux cette activité, l'enzyme est aliquotée en sachet de 5g et conservée sous vide à -20°C.

III.3 Méthodes

III.3.1 Transformation de la graine

III.3.1.1 Broyage

L'étape de broyage est effectuée sur le site d'Onyx Développement, dans le hall pilote du laboratoire Tweed. Le broyage est effectué sur un batch de 5 kg de graines d'arachide à l'aide d'un broyeur MC15 (Stephan, Belgique). Une couronne avec une tête de coupe comprenant 19 dents et un écart

inter-dents de 0,2 mm est utilisée (figure III.1). Cette couronne tourne à une vitesse de 3000 tours/min (vitesse imposée par le broyeur) avec une puissance de 11 kW. Les graines d'arachide passent à sec dans le broyeur en une fois et le broyat est alors récupéré dans un seau fermé et stocké à 4°C. Chaque broyat est conservé pendant une durée maximale de 3 mois.



Figure III.1 : Photos du broyeur MC15 utilisé (à gauche), ainsi que de la couronne (en haut à droite) et la tête de coupe (en bas à droite)

III.3.1.2 Préparation de la suspension

La suspension d'arachide est préparée à partir du broyat, d'eau courante et de sel de table. Par souci de commodité, cette suspension sera appelée « mix » dans le reste de ce manuscrit. Ce mix contient 685 g d'eau courante, 295 g d'arachide broyée, ainsi que du sel (NaCl). La quantité de NaCl dans le mix est pesée de sorte à préparer des suspensions à une force ionique de 0,5 mol/L (ajout de 20 g de NaCl) ou 0,8 mol/L (ajout de 32 g de NaCl). L'eau contenue dans la graine d'arachide (≤4 g/100 g de graine) est considérée négligeable dans le calcul de la force ionique.

Le mélange est préparé dans un Thermomix® TM5 (Vorwerk, Allemagne) à vitesse 4 (1100 tours/min), à température ambiante pendant 15 minutes. Toutes les 5 minutes, les bords du Thermomix® sont raclés avec une spatule pour assurer l'uniformité du mixage. Après le dernier raclage, la suspension est récupérée dans des pots en polypropylène avec bouchon à vis de contenance 180 mL (VWR, Etats-Unis). Ces pots sont conservés à 4°C pour une durée maximale d'une semaine de façon à éviter une évolution microbiologique des échantillons. Chaque échantillon est remis à température ambiante et mélangé de nouveau par agitation magnétique (1000 rpm) 5 minutes avant

utilisation. Cela permet de remettre en suspension les échantillons susceptibles d'avoir sédimenté. La suspension obtenue a un pH de 6,4±0,2.

III.3.1.3 Fractionnement des composants du mix par centrifugation

III.3.1.3.1 Fractionnement « standard »

Afin de séparer les différents composants du mix, une centrifugation est réalisée à 10 000g pendant 2 heures et à 25°C. Des échantillons de 40 g de mix sont centrifugés dans des tubes de centrifugation Falcon™ de 50mL (VWR, Etats-Unis) à l'aide d'une centrifugeuse 3-18K de Fisher Scientific (Etats-Unis) équipée d'un rotor Sigma 12159. A l'issue de la centrifugation, trois fractions sont obtenues (surnageant, fraction intermédiaire, culot). Le contenu de chacune de ces fractions est transféré dans des tubes en polypropylène conservés à 4 °C. Leur temps de conservation n'excède pas 7 jours après préparation du mix dont ils sont issus. Les paramètres de centrifugation utilisés permettent de séparer nettement chaque fraction. La récupération des différentes fractions contenues dans le tube (après centrifugation) reste cependant particulièrement délicate, les phases séparées pouvant facilement se re-mélanger, au moins localement. Un soin particulier est donc apporté à cette étape délicate pour obtenir les fractions les plus « propres » possible. Ce protocole standard est utilisé pour séparer les différentes fractions du mix et les caractériser (bilan matière des composants et microstructure). Il est également utilisé pour récupérer la phase intermédiaire et les protéines solubles qu'elle contient.

III.3.1.3.2 Fractionnement pour l'extraction « douce » du surnageant

La centrifugation à 10 000 g pendant 2 heures est efficace pour maximiser la séparation des différentes phases. Cependant, elle peut engendrer la coalescence des corps lipidiques. Un barème de centrifugation plus doux, à 250 g pendant 30 minutes, permet de récupérer un surnageant dans lequel aucune trace de coalescence des corps lipidiques n'est observée. Dans ce cas, la fraction intermédiaire contient encore une fraction de lipides, qui peut être séparée par une nouvelle centrifugation à 250 g pendant 2 heures. Par ailleurs, la masse sèche du culot extrait avec ce barème correspond à celle du culot extrait à 10 000 g pendant 2 heures ; les fractions insolubles ont donc bien été complétement éliminées de la phase intermédiaire par sédimentation.

Pour préparer des solutions de protéines à différentes fractions volumiques en lipides, avec une phase lipidique non modifiée par la centrifugation, ce sont donc des centrifugations à 250 g pendant 30 minutes qui ont été utilisées pour fractionner le mix. Différents protocoles sont utilisés (figure III.2) :

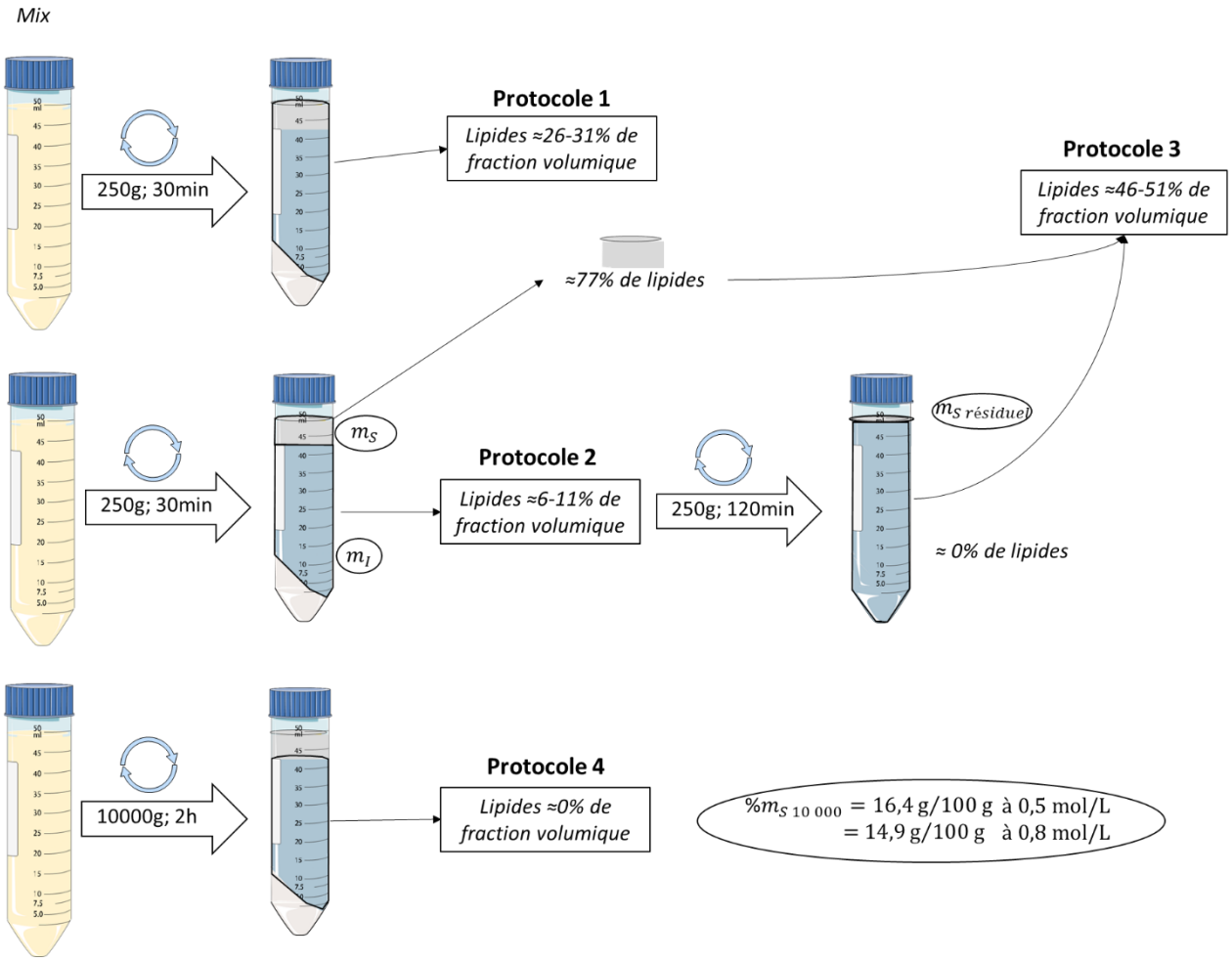


Figure III.2 : Protocoles de préparation des échantillons à différentes fractions volumiques en lipides. La variabilité des concentrations en lipides des échantillons est indiquée dans les encadrés.

1) Pour préparer des solutions de protéines contenant une fraction volumique en lipides équivalente à celle du mix, les fractions intermédiaires et le surnageant sont récupérés et mélangés (protocole n°1, figure III.2).
2) Pour préparer des solutions avec une fraction volumique en lipides de l'ordre de 7 %, seule la fraction intermédiaire est récupérée (protocole n°2, figure III.2).
3) Pour préparer des solutions avec une fraction volumique élevée, de l'ordre de 40 %, deux étapes successives sont réalisées : une première centrifugation permet de récupérer la phase lipidique non coalescée, qui est ensuite dispersée, dans les quantités désirées, avec une phase

intermédiaire obtenue par deux centrifugations successives à 250 g (protocole n°3, figure III.2)

4) Enfin, la phase intermédiaire dépourvue de corpuscules lipidiques est obtenue par une centrifugation du mix à 10 000 g, pendant 2 heures (protocole n°4, figure II.2).

Après centrifugation à 250 g, le surnageant récupéré contient essentiellement des corps lipidiques, dispersés dans une phase aqueuse (minoritaire) dont la composition est celle de la phase intermédiaire. La phase intermédiaire, elle, contient également une petite fraction de corps lipidiques. Le calcul de la fraction volumique de la phase dispersée (lipides) nécessite donc de tenir compte du fait que les surnageants et phases intermédiaires utilisées ne sont pas des phases pures. Ces fractions ont dont été évaluées de la façon suivante.

La quantité de corps lipidiques dans la fraction intermédiaire, obtenue après une centrifugation 250 g pendant 30 minutes, est estimée et exprimée en pourcentage par l'équation suivante :

$$\%m_{S\ dans\ I} = \frac{m_{S\ résiduel\ dans\ I}}{m_I} \qquad (9)$$

avec *m* la masse (en g), *%m*, le pourcentage massique (sans unité), *S* et *I* les indices relatifs au surnageant et à la fraction intermédiaire et $m_{S\ résiduel}$, le surnageant contenu dans la fraction intermédiaire récupérée après une centrifugation à 250 g pendant 30 minutes, et re-centrifugé à 250 g pendant 2 heures.

La quantité de fraction intermédiaire contenue dans le surnageant obtenu après une centrifugation à 250 g est obtenue en se basant sur les masses de surnageant obtenues après une centrifugation à 10 000 g pendant 2 heures.

$$\%m_{I\ dans\ S} = \frac{\%m_S - \%m_{S\ 10\ 000}}{\%m_S} \qquad (10)$$

avec $S_{10\ 000}$ le surnageant après une centrifugation à 10 000 g pendant 2 heures.

On peut alors calculer la masse de lipides dispersés dans cet échantillon, qui correspond à la masse de surnageant incorporée dans cet échantillon, corrigée de la fraction intermédiaire contenue dans le surnageant et de la masse de surnageant présent dans la fraction intermédiaire, le tout multiplié par la concentration massique en lipides du surnageant obtenu après centrifugation à 10 000 g pendant 2 heures.

$$m_{lipides\ dans\ S+I} = (m_S - (m_S \times \%m_{I\ dans\ S}) + (m_I \times \%m_{S\ dans\ I})) \times \%m_{lipides\ dans\ S_{réel}} \quad (11)$$

On peut ensuite en déduire la masse de phase continue dans l'échantillon.

$$m_{phase\ continue\ dans\ S+I} = m_S + m_I - m_{lipides\ dans\ S+I} \quad (12)$$

Enfin, on peut déduire de ces masses les volumes des lipides et de la phase continue dans l'échantillon.

$$V_{lipides\ dans\ S+I} = \frac{m_{lipides\ dans\ S+I}}{\rho_{huile\ d'arachide}} \quad (13)$$

$$V_{phase\ continue\ dans\ S+I} = \frac{m_{phase\ continue\ dans\ S+I}}{\rho_I} \quad (14)$$

La densité ρ_I a été estimé à 1,06 d'après les densités de solutions aqueuses en fonction de leur concentration en protéines et de la force ionique (Dougherty, 2001; Fischer et al., 2009). La densité $\rho_{huile\ d'arachide}$ de 0,912 est issue de la bibliographie (Davis et al., 2013; Ollivier et al., 2015)

Chaque échantillon est conservé pendant un maximum de 3 jours à 4°C. Il est ensuite remis à température ambiante puis mélangé par action d'un barreau aimanté pendant 15 minutes avant les étapes de gélification.

III.3.1.3.3 Fractionnement pour l'extraction « propre » du culot

Pour étudier l'effet des constituants insolubles contenus dans le culot sur les propriétés de gels de protéines d'arachide, ces insolubles ont été extraits par centrifugation à 10 000 g pendant 2 heures. Le culot récupéré contient cependant encore une partie de la fraction intermédiaire piégée entre les particules sédimentées, cette phase intermédiaire contenant des protéines et autres composés solubilisés dans cette phase. Différentes étapes de lavage ont donc été réalisées avec des solutions aqueuses de NaCl. Pour ne pas modifier l'environnement physico-chimique des constituants insolubles, ces lavages ont été réalisés avec des solutions salines de même force ionique que la phase intermédiaire initiale, comme indiqué sur la figure III.3. Le volume réintroduit pour les lavages correspond au volume de surnageant éliminé à chaque centrifugation.

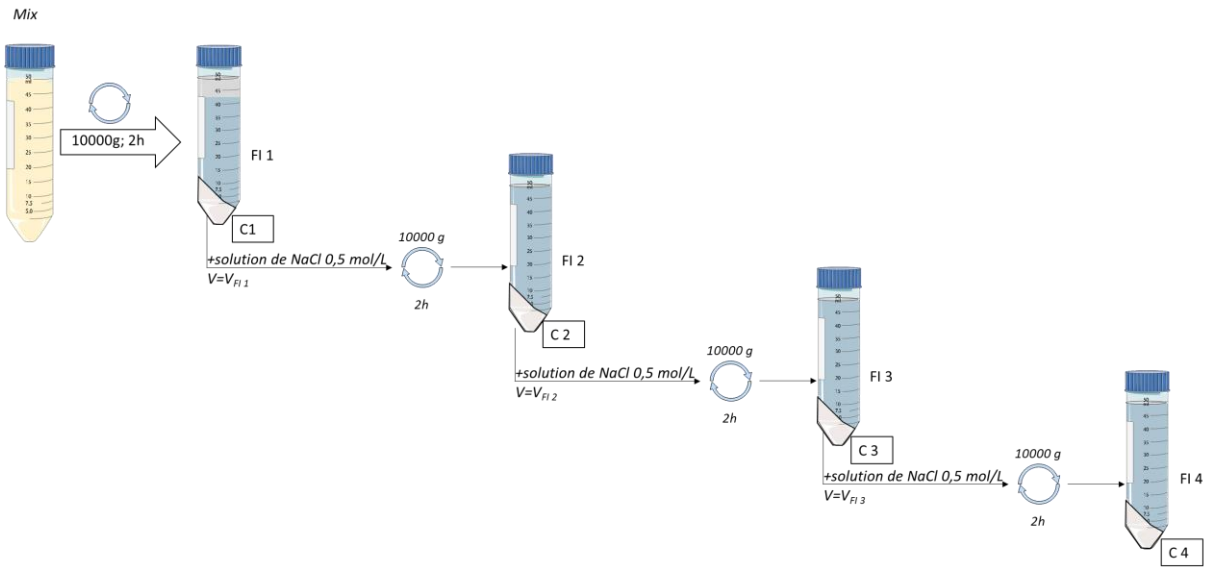


Figure III.3 : Processus de lavage et étapes de séparation du culot. FI : Fraction intermédiaire ; C : Culot.

III.3.1.4 Préparation d'extraits protéiques de concentration et de force ionique maîtrisées

III.3.1.4.1 Préparation d'un concentrat protéique

Afin de disposer d'échantillons de concentrations variables en protéines solubles, la fraction intermédiaire qui contient ces protéines est lyophilisée pour obtenir un concentrat de protéines sous forme de poudre. Pour cela, la fraction intermédiaire est tout d'abord congelée à -80°C pendant 24 heures afin de minimiser la décongélation du produit lors de la descente en pression dans le lyophilisateur. Elle est ensuite lyophilisée dans un lyophilisateur Alpha 2-4 LD_{plus} (Martin Christ, Allemagne). La lyophilisation s'effectue à -80°C et à 0,01 mbar et dure 48 heures. Un maximum de 2 kg de fraction intermédiaire répartie en vingt fois 100 g peut être lyophilisée en une opération. A la fin de la lyophilisation, les concentrats de protéines sont récupérés sous forme de poudres (~10 g pour 100 g de fraction intermédiaire), réunis et conservés à 4°C dans un récipient en verre fermé. Chaque concentrat est conservé pendant un maximum de 2 mois avant utilisation. Huit concentrats ont ainsi été préparés, chacun issu de 1 à 2 kg de fractions intermédiaires (quatre issus de fraction intermédiaire extraite à 0,5 mol/L et quatre issus de fraction intermédiaire extraite à 0,8 mol/L). La concentration en protéines de chaque concentrat est ensuite quantifiée par la méthode de Kjeldahl (III.4.3).

III.3.1.4.2 Préparation d'une solution de protéines de concentration et de force ionique maîtrisées

Le concentrat lyophilisé contient dans sa matière sèche du sel, en plus des protéines et d'éventuels autres composants (glucides simples) présents dans la fraction intermédiaire. Après redispersion de ce concentrat dans de l'eau, la concentration en sel des échantillons est donc proportionnelle à la concentration en protéines. Pour préparer des solutions de protéines tout en contrôlant indépendamment la concentration en protéines et la force ionique, une étape de dialyse pour équilibrer la force ionique des échantillons est réalisée sur les solutions. Pour cela, des bains de dialyse de 1,5 L sont préparés avec des solutions de NaCl de force ionique contrôlée, à 0,5 ou 0,8 mol/L. Pour toute concentration en protéines testée, les échantillons sont préparés pour une masse totale (eau distillée + concentrat) de 60 grammes, puis agités 15 minutes à l'aide d'un barreau aimanté. Les échantillons sont alors versés dans des boudins de dialyse Spectra/Por avec un seuil de coupure de 3 kDa (Spectrum, Etats-Unis). Les bains de dialyse, contenant jusqu'à cinq boudins, sont stockés à 4°C pour éviter une évolution microbiologique à l'intérieur des boudins. La dialyse dure 48 heures et les bains de dialyse sont renouvelés trois fois au cours de ces 48 heures. Les échantillons sont pesés après leur récupération dans des pots fermés afin d'estimer le facteur de dilution survenu pour chacun d'eux lors de la dialyse et de calculer la concentration réelle en protéines de l'échantillon. Les échantillons sont utilisés dans les 3 jours qui suivent leur récupération.

Ainsi, à partir des protéines extraites à 0,5 mol/L de NaCl, des solutions à 0,5 ou 0,8 mol/L de force ioniques peuvent être réalisées. Il en sera de même pour les protéines extraites à 0,8 mol/L de force ionique.

III.3.2 Analyse biochimique de la suspension

III.3.2.1 Mesures de stabilité de la graine et du broyat

Afin de s'assurer que le stock de graine d'arachide ne se dégrade pas au cours du stockage du début à la fin de la thèse, une mesure de l'indice de peroxyde, indicateur de l'oxydation des lipides, est effectué sur des graines tous les 6 mois. Aucune évolution de l'indice de peroxyde n'a été observée au cours de la thèse (indice de peroxyde < 0,1 mM O_2 / kg d'huile). Cette mesure a été effectuée en externe (norme ISO 3960) (ISO 3960, 2017).

Une fois la graine d'arachide broyée, le broyat est conservée pour une durée maximum de trois mois à 4°C. Des mesures (externalisées) ont été effectuées pour s'assurer que sa composition biochimique (humidité, protéines, lipides totaux, glucides totaux, minéraux) n'évoluait pas au cours du stockage. Les protéines ont été mesurées par la méthode de Kjeldahl, les lipides, l'humidité et les minéraux par des méthodes internes au laboratoire d'analyse et la concentration en glucides a été calculée par différence.

De même, des mesures ont été effectuées afin de s'assurer que le broyat n'était pas contaminé (mesure de la flore totale aérobie, des levures et des moisissures) au cours du stockage. La flore aérobie a été mesure selon la norme ISO 4833-1 et les levures et moisissures selon la norme V 08-059 (ISO 4833-1, 2013; V 08-059, 2002). Les valeurs mesurées correspondent au seuil minimum de détection de chacune des méthodes d'analyses et n'évoluent pas après 4 mois de stockage à 4°C (flore aérobie < 10 000 ufc/g ; levures < 100 ufc/g et moisissures < 300 ufc/g).

III.3.2.2 Détermination de la matière sèche

La matière sèche est obtenue en pesant précisément 2 g d'échantillon (masse initiale) dans une capsule en aluminium, puis en les plaçant dans une étuve (EM10, Chopin Technologies, France) pendant 2h30 à 105°C, avec un contrôle de la température assuré par un régulateur Gefran 800 (Gefran, Italie). Après incubation, les échantillons sont placés dans un dessicateur jusqu'à retour à température ambiante puis pesés (masse finale). Il a été vérifié que la quantité d'eau évaporée n'évoluait plus après 2h30 de dessiccation. La masse sèche est ensuite calculée avec l'équation suivante :

$$Masse\ sèche\ (\%) = \frac{Masse\ finale\ (g)}{Masse\ initiale\ (g)} \times 100 \qquad (15)$$

III.3.2.3 Extraction et quantification des lipides

Les lipides sont extraits par extraction accélérée par solvant (ASE, Accelerated Solvent Extraction) à l'aide d'un système Dionex ASE® 350 (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). Pour cela, 6 g d'échantillon sont soigneusement mélangés avec 5 g de terre de diatomée (Dionex ASE® Prep DE, Thermo Fisher Scientific) et placés dans les cellules ASE. Les lipides sont ensuite extraits sous une pression de 1500 psi par trois cycles d'extraction successifs de 5 minutes à 90 °C, à l'aide d'un mélange heptane/isopropanol (5/1, v/v) afin de permettre l'extraction des triglycérides et des phospholipides (McConnell and Farag, 2013; Yan et al., 2008). Après extraction, les tubes sont

récupérés et placés dans un dispositif d'évaporation multiple (multivapor P-12, Büchi, Suisse) à 150 mbar puis sous un flux d'azote afin d'évaporer les solvants d'extraction. Le résidu obtenu est pesé afin de déterminer la teneur en lipides des échantillons.

III.3.2.4 Quantification des protéines par la méthode de Kjeldahl

La teneur en protéines des échantillons est calculée à partir de la teneur en azote total déterminée par la méthode de Kjeldahl. Il s'agit d'une méthode en trois étapes : la minéralisation de l'azote organique, la distillation de l'ammoniac déplacé de son sel par de la soude et le dosage acido-basique. L'échantillon (de 0,1 g pour les concentrats à 3 g pour le mix) est tout d'abord minéralisé dans un SpeedDigester K-439 (Büchi, France) avec de l'acide sulfurique 96 % (10 mL par échantillon), en présence du catalyseur de Kjeldahl (10 g) et d'antimousse (2 g) sous forme de comprimés. Le gradient de température utilisé pour cette étape de minéralisation est le suivant : 300°C pendant 40 minutes, 400°C pendant 20 minutes, 520°C pendant 90 minutes, puis refroidissement à température ambiante. L'ammoniac est ensuite déplacé de son sel (sulfate d'ammonium) par ajout automatique de 50 mL de soude concentrée (33 %, p/v) dans le tube de minéralisation et distillation pendant 8 minutes dans un distillateur Kjeldahl Pro Nitro M (Selecta, Espagne), puis piégeage dans 25 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol/L contenant 6 gouttes d'un indicateur coloré, le rouge de méthyle. L'acide chlorhydrique en excès est ensuite dosé en retour par de la soude 0,1 mol/L. Cela permet de calculer la quantité d'acide chlorhydrique qui a réagi, puis de remonter ainsi à la masse d'azote contenue initialement dans l'échantillon et enfin à la masse de protéines de l'échantillon en appliquant un facteur de conversion (équation 16). Pour l'arachide, ce facteur est de 5,46, en considérant environ 18,3g d'azote pour 100 g de protéines (Misra, 2001).

$$m_{protéines} = (n_{HCl\ réagi} \times M_N) \times 5{,}46 \qquad (16)$$

Avec M_N la masse molaire de l'azote (M_N=14 g/mol)

III.3.2.5 Dosage des protéines solubles par spectrophotométrie

Les protéines solubles de certains échantillons ont pu être estimées à partir de la mesure d'absorbance des surnageant issus de centrifugation (chapitre VI.2) par spectrophotométrie. Pour cela, les échantillons sont dilués au 100ème dans de l'eau distillée, puis filtrés avec des filtres Minisart™ PES 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech™, France). L'absorbance des échantillons est alors mesurée à 280 nm par un spectrophotomètre Cary Series UV-Vis (Agilent Technologie, Etats-Unis).

La quantité de protéines solubles a alors été déterminée en prenant comme référence un échantillon pour lequel la quantification a été faite par mesure de Kjeldahl parallèlement à la mesure de l'absorbance.

III.3.2.6 Dosage des groupements SH des protéines de la fraction intermédiaire

Les groupements SH sont quantifiés à l'aide de la méthode d'Ellman (Segat et al., 2014; Shen et al., 2017). Pour cela, une solution de réactif d'Ellman (acide 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoïque), DTNB) à une concentration de 4 mg/mL est préparée dans un tampon urée-Tris-glycine-EDTA (8 mol/L d'urée ; 0,086 mol/L de Tris ; 0,09 mol/L de glycine et 4 mmol/L d'EDTA ; pH=8). En présence de thiols, le DTNB est clivé et libère une molécule d'acide thionitrobenzoïque absorbant à 412 nm (coefficient d'extinction molaire, ε_{412}=13 600 L.mol^{-1}.cm^{-1}).

A 500 µL d'un échantillon contenant 5 à 10 mg/mL de protéines sont ajoutés 2,5 mL de tampon urée-Tris-glycine-EDTA puis 20 µL de réactif d'Ellman. Le mélange est assuré par retournement. Après 15 minutes de réaction à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 412 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Carry 100 UV-VIS (Agilent Technologies, USA).

La concentration en groupements SH totaux dans les protéines est alors calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$[\mathrm{SH}]_{(\mu\mathrm{mol\ SH\ /\ g})} = \frac{73{,}53 \times \mathrm{A}_{412}}{[\text{protéines}]} \qquad (17)$$

avec A_{412} l'absorbance à 412 nm, [protéines] la concentration en protéines (en mg/mL). La valeur de 73,53 correspond à l'inverse du coefficient d'extinction molaire de l'acide thionitrobenzoïque.

III.3.2.7 Mesure de l'hydrophobicité de surface des extraits protéiques

L'hydrophobicité de surface est mesurée par fluorescence (Segat et al., 2014; Shen et al., 2017) à l'aide d'une sonde de fluorescence 1-anilino-8-naphtalensulfonate (ANS). Chaque échantillon est dilué à l'aide d'un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,0) en cinq échantillons de concentrations comprises entre 0,0025 et 0,02 % (m/v). Un volume de 20 µL d'ANS à une concentration de 8 mM dans un tampon phosphate de sodium 50 mM est ensuite ajouté à 4 mL de chacun des échantillons dilués. Les tubes fermés sont mélangés par retournement afin d'assurer leur

homogénéité. L'intensité de fluorescence est alors mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Carry 100 UV-VIS (Agilent Technologies, USA). Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont de 390 nm et de 470 nm, respectivement. Pour chaque solution de protéines diluée, l'intensité de fluorescence relative (IFR) est calculée selon la relation :

$$IFR = \left(\frac{F - F_0}{F_0}\right) \quad (18)$$

avec F, la fluorescence du conjugué protéine-ANS et F_0, la fluorescence de la sonde ANS seule.

L'indice d'hydrophobicité de surface IHS est calculé à partir de la pente initiale de la droite représentant IFR en fonction de la concentration en protéines des solutions diluées.

III.3.2.8 Analyse du profil protéique de la fraction intermédiaire par électrophorèse SDS-PAGE

L'analyse électrophorétique est menée à l'aide du système Mini-PROTEAN Tetra, de gels Mini-PROTEIN TGX et de marqueurs Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad, Etats-Unis) de poids moléculaires 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 15 et 10 kDa.

Les suspensions de protéines étudiées sont diluées dans de l'eau distillée pour obtenir une solution de protéines (5 µg de protéines par µL), ensuite mélangée à un volume équivalent de tampon Laemmli 2X contenant 5 % (v/v) de β-mercaptoéthanol (electrophoresis reagent ≥98 %, Sigma Aldrich, Etats-Unis), 40 % (v/v) de glycérol (reagent plus, 99%, Sigma Aldrich, Etats-Unis), 12,5 % (v/v) de Tris-HCl (ACS reagent, 99,8%, Sigma Aldrich, Etats-Unis ; 0,5 mol/L, pH 6,8), 20 % (v/v) de SDS (Merck, Allemagne) dilué au 10ème, 1 % (v/v) de bleu de bromophénol (ACS reagent, Sigma Aldrich, Etats-Unis) et 21,5 % (v/v) d'eau distillée. Un volume de 10 µL d'échantillon est ensuite déposé dans les puits du gel électrophorétique. La migration électrophorétique est effectuée à 200 V dans un tampon de migration contenant 1 % (v/v) de SDS (dodécylsulfate de sodium), 250 mmol/L de Tris et 1,92 mol/L de glycine (≥98 %, Sigma Aldrich, Etats-Unis) avec un pH final de 8,3. Une fois la migration terminée, le gel est récupéré, coloré à l'aide de bleu brillant de Coomassie R250 (Bio-Rad, Etats-Unis) pendant une heure, puis l'excès de bleu de Coomassie est éliminé par trempage du gel pendant 15 minutes dans trois bains consécutifs d'eau distillée. Il est enfin scanné dans un densitomètre GS-800 Calibrated (Bio-Rad, Etats-Unis) et les images obtenues sont analysées à l'aide du logiciel PD Quest 2-D Gel Analysis (ver. 6-2-1). Cette analyse par densitométrie permet de

comparer l'intensité des bandes électrophorétiques obtenues par mesure de différences entre plusieurs échantillons sur un même gel, et de déterminer la significativité statistique de ces différences par le test de Student.

III.3.3 Analyse structurale de la suspension et de ses fractions

Les distributions de taille et les observations en microscopie ont été réalisées sur la suspension et ses fractions. Des observations de la microstructure des gels ont été réalisées en microscopie.

III.3.3.1 Mesure de taille

III.3.3.1.1 Mesure des tailles par diffraction laser

Les distributions granulométriques des différents éléments présents dans la suspension ont été mesurées par granulométrie à diffraction laser avec un MasterSizer 2000 (Malvern Instruments, Royaume-Uni). Pour cela, les échantillons sont dilués au $100^{ème}$ (p/p) dans de l'eau distillée, puis soumis 5 minutes à une agitation à l'aide d'un barreau aimanté (rpm =1000). Un indice de réfraction de 1,33 est sélectionné pour l'eau utilisée comme dispersant et de 1,45 pour l'arachide (inspiré de l'indice de réfraction de l'huile de colza, suggéré par le logiciel). L'indice d'absorption est fixé à 0,001. La mesure est effectuée à 17 % d'obscuration du laser.

III.3.3.1.2 Mesure des tailles par diffusion dynamique de rayonnement

Pour des mesures de tailles plus petites (inférieures au micromètre), telles que le suivi de l'agrégation des protéines au cours du traitement enzymatique, la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) a été utilisée. Les mesures sont réalisées avec un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Royaume-Uni). L'indice d'absorption est fixé à 0,001 et l'indice de réfraction à 1,33 pour le dispersant et 1,45 pour l'échantillon d'après les recommandations du logiciel pour l'eau et les protéines. Les mesures sont effectuées à 25°C et un temps d'équilibrage de l'échantillon de 2 minutes. Quatre mesures sont ensuite effectuées par échantillon. Cette méthode permet de mesurer des tailles d'objets entre 10 nm et 1 µm *via* la mesure de la diffusion des particules et des molécules soumises

au mouvement brownien et de la relation de Stokes-Einstein. Une distribution de la taille des particules et molécules est alors calculée par la méthode des moindres carrés.

III.3.3.2 Observation microscopique

III.3.3.2.1 Microscopie optique

Avant observation au microscope optique, un volume d'échantillon de suspension est dispersé dans dix volumes d'eau distillée, puis une goutte de cette suspension est déposée sur une lame de verre, qui est ensuite recouverte d'une lamelle. Les échantillons sont ensuite observés à grossissement x20, x40 et x50 avec un microscope BX 51 (Olympus, Japon). Pour la détection des protéines et des lipides, des marqueurs fluorescents sont utilisés, respectivement le DyLight 550 et le Bodypy 493/503 (ThermoFisher Scientific, Etats-Unis), en mélangeant 20 µL de marqueurs, préalablement dilués au $10^{ème}$, dans 1 mL d'échantillon, avec des filtres à 488 et 550 nm en sortie de la source lumineuse de façon à exciter les marqueurs. L'amidon est observé sous lumière polarisé ainsi que par marquage à l'iode (10 µL de I_2 dans 1 mL d'échantillon).

III.3.3.2.2 Microscopie optique confocale laser

Les images de microscopie optique confocale ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal inversé TCS SP8 ABS (Leica, Allemagne). Deux lasers sont couplés lors de l'observation : un laser hélium-néon (longueur d'onde = 458 nm) et un laser argon (longueur d'onde = 633nm). L'intensité des lasers est contrôlée pour chaque image. Les lipides sont marqués par le Bodipy 665/676 nm (Invitrogen, Etats-Unis) et les protéines par le DyLight 488 nm (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). Chaque marqueur est préparé à 0,5 mg/mL dans de l'eau distillée. Dans le cas d'un échantillon solide, tel qu'un gel ou un culot dense, 2 µL d'un mélange 50:50 (v/v) des deux marqueurs sont déposés sur l'échantillon avant observation. Dans le cas d'un échantillon liquide, 5 µL du mélange des chromophores sont mélangés dans 200 µL d'échantillon avant dépôt entre lame et lamelle. Les images sont ensuite récupérées via le logiciel LAS X 3.5.2.18963 (Leica, Etats-Unis).

Pour les images de gels, ces derniers sont préparés dans des tubes placés au bain-marie pour imposer un traitement thermique, avant de procéder aux analyses de microstructure. 30 g d'échantillon sont placés dans un tube de polypropylène fermé de diamètre 5,2 cm et chauffé au bain-marie. Une fois le traitement de chauffage fini, le tube est sorti du bain-marie et laissé à refroidir à température ambiante avant observation.

III.3.3.3 Analyse de la sédimentation des échantillons

Afin de s'assurer que les échantillons contenant des particules (mix et culot resuspendus en phase aqueuse) ne sédimentaient pas lors de la gélification, leur stabilité a été mesurée à l'aide d'un Turbiscan^{Lab} (Formulaction, France). Un volume fixe d'échantillon à température ambiante et préalablement agité manuellement est introduit à l'aide d'une pipette pasteur dans une cellule de verre cylindrique prévue spécifiquement pour cette mesure. Un faisceau laser (880 nm) balaye alors la hauteur de l'échantillon et les capteurs enregistrent l'intensité transmise et l'intensité rétrodiffusée par l'échantillon tous les 40 µm, sur la hauteur totale de l'échantillon. Un balayage est réalisé toutes les 5 minutes pendant 2 heures, à 25°C (température ambiante) et à 40°C (température du traitement enzymatique). L'instrument ne permet pas de chauffer au-delà de 60°C, on fait donc l'hypothèse qu'un échantillon qui, sur un temps donné, ne sédimente ni à température ambiante ni à 40°C, ne sédimentera pas non plus à 95°C puisque l'échantillon est susceptible de gélifier à cette température, ce qui compenserait une éventuelle sédimentation.

III.3.4 Mesures des propriétés mécaniques et rhéologiques des gels

III.3.4.1 Caractérisation des propriétés rhéologiques

Pour suivre la gélification de l'échantillon *in situ*, un rhéomètre MCR301 (Anton Paar, Autriche) a été utilisé. L'échantillon liquide (≈20 mL) à température ambiante est versé dans le godet, puis la sonde (un cylindre coaxial de 27 mm de diamètre) descend dans l'échantillon. Le dispositif permet d'avoir un entrefer de 1 mm (voir figure III.4). Une couche d'huile de silicone (de viscosité 1 mPa/s^{-1} à 25°C) est ajoutée en surface de l'échantillon afin de prévenir l'évaporation de l'eau contenue dans les échantillons lors d'un traitement thermique.

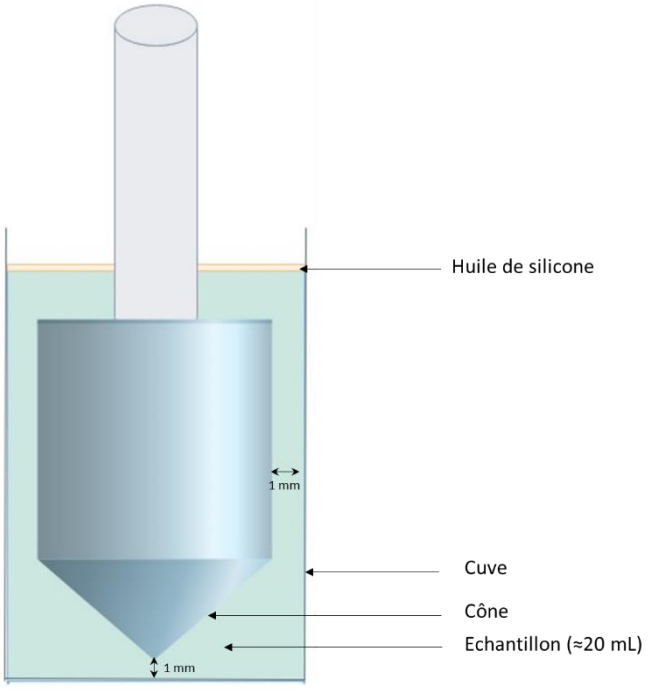


Figure III.4 : Schéma du dispositif de mesure de rhéologie par un système de type cylindre coaxial

Toutes les mesures de suivi de gélification sont effectuées en oscillation (précision du couple = 0,5 nNm) à une fréquence de 1 Hz et une déformation de 1 %. Il a été vérifié en amont que ces conditions ne perturbaient pas la formation du gel et permettaient d'être dans le domaine linéaire de viscoélasticité (LVE) en fin de gélification. La température contrôlée par système Peltier et la contrainte résultant de la déformation sont suivies au cours du temps. La contrainte est reliée proportionnellement à la déformation par un module complexe G* qui peut être décomposé en deux modules, le **module de conservation** (ou module élastique ; G') et le **module de perte** (ou module visqueux ; G''). Ces valeurs sont obtenues *via* le logiciel RheoCompass™ puis exportées et traitées à l'aide du logiciel Excel. Le module de conservation G' correspond à la composante élastique d'un matériau (ici, un gel), c'est-à-dire sa tendance à stocker l'énergie lorsqu'il est soumis à une contrainte, et à reprendre sa forme initiale lorsque la contrainte cesse. A l'inverse, le module de perte G'' correspond à la composante visqueuse du matériau, c'est-à-dire sa tendance à dissiper l'énergie reçue lorsqu'une contrainte est imposée et à s'écouler de façon irréversible.

Le ratio G''/G', appelé **tan δ** ou angle de perte, rend compte du niveau de structuration. Un tan δ inférieur ou égal à 1 permet de qualifier le système étudié de gel. La température de l'échantillon est stabilisée à 25°C pendant 15 minutes au début de chaque protocole. A la fin de chaque suivi de gélification, un balayage en fréquence est fait de 0,01 Hz à 100 Hz (amplitude de déformation = 1 % ; augmentation logarithmique en 20 points), comme présenté en figure III.5 B. Enfin, un balayage

en déformation est imposé, de 0,1 à 1000 % de déformation (fréquence = 1 Hz ; augmentation logarithmique en 24 points) (voir figure III.5 C).

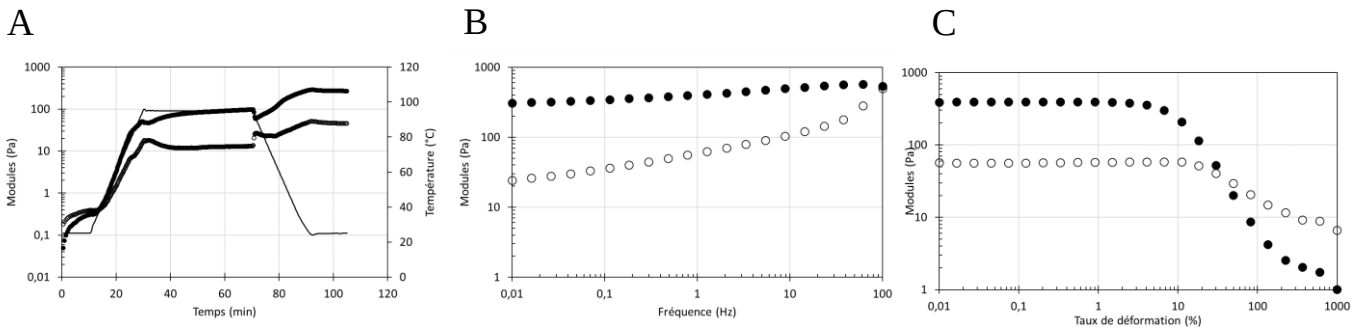


Figure III.5 : Courbes types obtenues en rhéologie durant le suivi d'un processus de gélification, puis la caractérisation du gel obtenu. Les modules de conservation et de perte sont ici suivis à titre d'exemple dans le cas d'un gel thermique. Suivi au cours du temps, à fréquence et taux de déformation constants, du processus de gélification (A), puis réalisation d'un spectre en fréquence (B) suivi d'un spectre en déformation (C)

Plusieurs procédés de gélification ont été utilisés au cours de la thèse. L'échantillon passe les 10 premières minutes dans la cuve à se stabiliser à 25°C. Les gels ont tout d'abord été préparés par traitement thermique (90°C pendant 30 minutes), par acidification (avec 5% (p/p) de GDL à 25°C), ou par traitement enzymatique (avec 0,3% (p/p de mix) de mTG, ajoutée et mélangée pendant 5 minutes par agitation magnétique, avant que la solution ne soit portée 20 min à 40°C puis 16h30 à 25°C. Toutes les cinétiques de montée et de descente en température sont de 3,5°C/min, et la température est redescendue à 25°C après un traitement thermique. L'échantillon est suivi *in situ* pour une durée totale de 17 heures dans chaque cas. Des modifications de paramètres et des associations entre ces procédés initiaux ont par la suite pu être appliquées. Ainsi, deux procédés ont principalement été utilisés: un traitement thermique à 95°C pendant 40 minutes, et un prétraitement enzymatique avec de la mTG (0,3g/100g) à 40°C pendant 3 heures, suivi du même traitement thermique à 95°C pendant 40 minutes. Pour ces deux procédés-ci, la stabilisation à 25°C en amont de la mesure est de 15 minutes, au lieu des 10 minutes initialement utilisées pour les procédés précédents.

A partir des courbes brutes obtenues, des grandeurs caractéristiques ont été extraites.

Le **point de gel** est pris, pour les suspensions de protéines, comme le croisement G'=G'' (Batista et al., 2005; Twomey et al., 1997). Pour les échantillons encombrés (suspensions de graine d'arachide, suspensions de protéines contenant aussi des particules ou des corps lipidiques), le module G' est parfois supérieur au module G'' avant même la prise en gel. Dans ce cas, c'est la **vitesse maximale de structuration** qui est choisie pour suivre le processus de prise en gel (Grosso and Rao, 1998).

Cette vitesse est déterminée comme étant la valeur calculée de dG'/dt la plus élevée pour un procédé. Ainsi, on peut déterminer une vitesse maximale lors d'un traitement thermique, et deux vitesses lors de la gélification d'échantillons prétraités par la mTG (une pendant le traitement enzymatique et l'autre pendant le post-traitement thermique).

Le **module élastique final** obtenu en fin de traitement, qu'on appellera ici G'_0.

La **limite de linéarité viscoélastique** (LVE) est déterminée sur le spectre en déformation comme étant le point à partir duquel le module de conservation G' perd 10 % de sa valeur au plateau, déterminée par moyenne de 6 points pris sur le plateau (Roger, 2015; Wereley et al., 2006).

Le **point de rupture, ou seuil d'écoulement**, est défini comme le pourcentage de déformation obtenu au point de croisement G'=G'' lors d'un spectre en déformation.

Le spectre en fréquence permet d'évaluer la dépendance du module élastique à la fréquence, selon l'équation $G' \sim \omega^x$ avec ω la fréquence angulaire en rad/s.

De mesures de texture ont également été effectués pour étudier les gels dans le domaine des grandes déformations (annexe II).

III.3.5 Tests statistiques

La significativité des différences entre les propriétés rhéologiques (différences entre échantillons gélifiés par différents procédés ou à des forces ioniques différentes) a été calculée par une analyse de la variance à un facteur (ANOVA). Le test statistique utilisé est un test de Student et le seuil de significativité a été choisi à $p \leq 0,05$. Les analyses ont été effectués avec le logiciel Excel du pack Microsoft Office Professionnel Plus 2015 (Microsoft, Etats-Unis) et le plugin « Utilitaire d'analyse ».

Chapitre IV : Caractérisation de la suspension d’arachide et de sa capacité gélifiante

L'arachide est composée de nombreux constituants présentés dans le chapitre bibliographique. Une fois les graines broyées et le broyat mixé dans une solution saline, certains d'entre eux seront susceptibles d'être solubilisés alors que d'autres pourront rester insolubles. L'objectif de cette partie est à la fois de mieux comprendre la répartition des différents constituants dans les différentes phases de la suspension aqueuse obtenue après broyage en présence d'eau, mais aussi d'étudier l'aptitude à la gélification de cette suspension. Pour cela, la composition de la suspension sera d'abord établie, puis la répartition des constituants dans les différentes phases de la suspension sera déterminée. La capacité de gélification de la suspension sera ensuite évaluée au travers de différents procédés de gélification, utilisés couramment pour la gélification des protéines.

IV.1 Composition biochimique du broyat et de la suspension

La composition biochimique du broyat de graines d'arachide est présentée en figure IV.1. On obtient alors 48 g/100 g de lipides, 23 g/100 g de protéines, 22 g/100 g de glucides et 7 g/100 g d'autres divers (eau, cendres, phosphore, minéraux). Cette composition reste stable au cours d'un stockage du broyat à 4°C et à l'abri de la lumière pendant quatre mois.

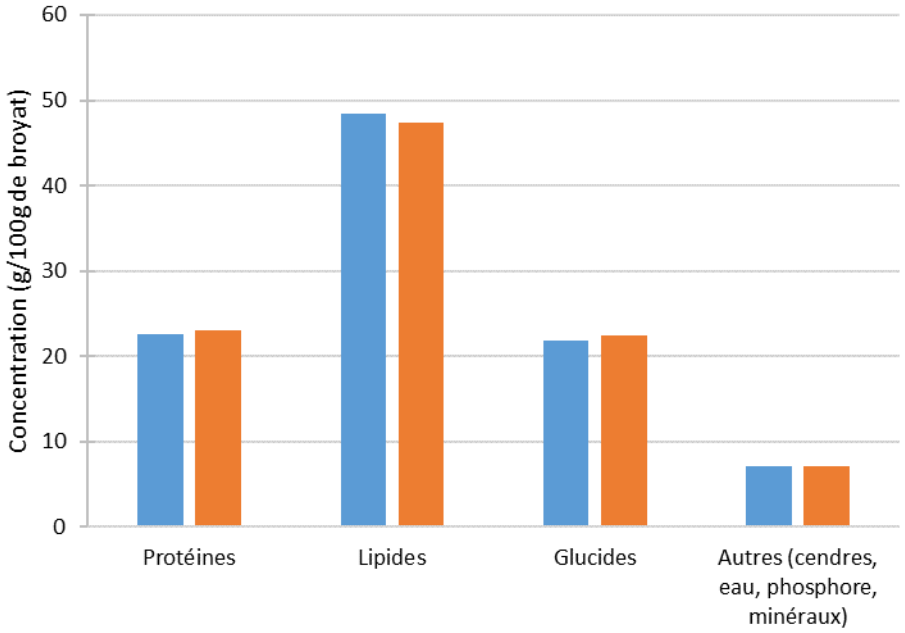


Figure IV.1 : Composition biochimique du broyat de graines d'arachide, juste après broyage (en bleu) et après 4 mois de stockage à 4°C (en orange). La teneur en glucides est calculée par soustraction de la fraction massique des autres composants. Les protéines sont mesurées par Kjeldahl avec un facteur N*5,46.*
**Résultats d'analyses externalisées*

La composition trouvée est similaire aux teneurs moyennes en macronutriments indiquées par les tables CIQUAL (ANSES, voir tableau I.1), notamment pour les taux en lipides et en protéines qui sont identiques. La composition déterminée est en revanche plus riche en glucides (+7 g/100 g), cet écart correspondant principalement aux fibres, qui ont ici été intégrées dans la mesure des glucides totaux, tandis que l'ANSES les considère à part, et en mesure 8,6 g/100 g de graine d'arachide.

Lors de la préparation du mix, le broyat est mixé au Thermomix® à 25°C en présence d'eau salée (pour obtenir une force ionique de 0,5 mol/L ou 0,8 mol/L). La proportion de broyat dans le mix est de 30 g /100 g, ce qui conduit à une dilution des constituants du broyat. La composition biochimique attendue est donc de 7,1; 14,5 et 6,5 g de protéines, lipides et glucides respectivement, pour 100 g de masse fraîche de mix (0,5 et 0,8 mol/L). La composition déterminée au cours de cette étude est présentée en tableau IV.1 pour chaque mix. Les données présentées en matière sèche ont été calculées d'après les mesures faites sur la masse humide et la mesure de la matière sèche des échantillons.

On retrouve bien dans les « autres non mesurés » les 22 g de glucides et les 7 g d'autres (minéraux, cendres) mesurés en figure IV.1, de même que les ~23 g/100 g de protéines. Cependant on mesure moins de lipides que sur le broyat, on mesure ici 39 à 44 g/100 g de lipides (respectivement à 0,5 et à 0,8 mol/L) contre 48 g/100 g obtenus par analyse externe. Cette différence peut s'expliquer par la présence de 2 g/100 g et 3,2 g/100 g de NaCl à 0,5 et à 0,8 mol/L qui réduisent donc la proportion des autres constituants. On observe également à 0,8 mol/L 1,3 g/100 g de plus de « autres », et 3,2 g/100 g de protéines en plus à 0,5 mol/L. Comme les constituants « autres » correspondent bien aux masses mesurées sur le broyat (glucides et autres) en figure IV.1, il semble que la différence dans la mesure des lipides soient imputables à l'ajout de sel, ainsi qu'à une proportion des lipides (~5 g/100 g de matière sèche) et de protéines (~5 g/100 g de matière sèche) qui ne soient pas mesurés dans le mix à 0,8 mol/L.

Afin d'étudier la structure du mix, celui-ci a été séparé en trois fractions constitutives par centrifugation : un surnageant liquide opaque, une fraction intermédiaire liquide et un culot solide (figure IV.2). Aucune différence visuelle ne peut être décelée entre le fractionnement d'un mix à 0,5 mol/L et celui d'un mix à 0,8 mol/L de force ionique.

Tableau IV.1 : Composition biochimique du mix d'arachide préparé par mélange du broyat dans une solution saline à 0,5 et à 0,8 mol/L de force ionique

	Masse humide (g/100 g)		**Masse sèche (g/100 g)**	
	0,5 mol/L	0,8 mol/L	0,5 mol/L	0,8 mol/L
Eau	69,7±0,7	68,8±0,5		
Protéines	7,9±0,3	6,6±0,1	26,2±1,4	21,2±0,6
Lipides	13,4±1,5	12,2±0,3	44,3±1,5	39,1±1,9
Sel	2,0±0	3,2±0	6,6±0,2	10,3±0,2
Autres	7,0±2,6	9,1±1	28,1±2	29,4±2,7

*La teneur en eau est déterminée par quantification de la matière sèche du mix, les protéines sont quantifiées par mesure de Kjeldahl (N*5,46) et les lipides par gravimétrie suite à une ASE. La masse de sel est calculée d'après la formule du mix, et les « autres » sont calculés par soustraction des autres fractions massiques. Les écarts-types sont obtenus par l'analyse de la composition de trois mix différents.*

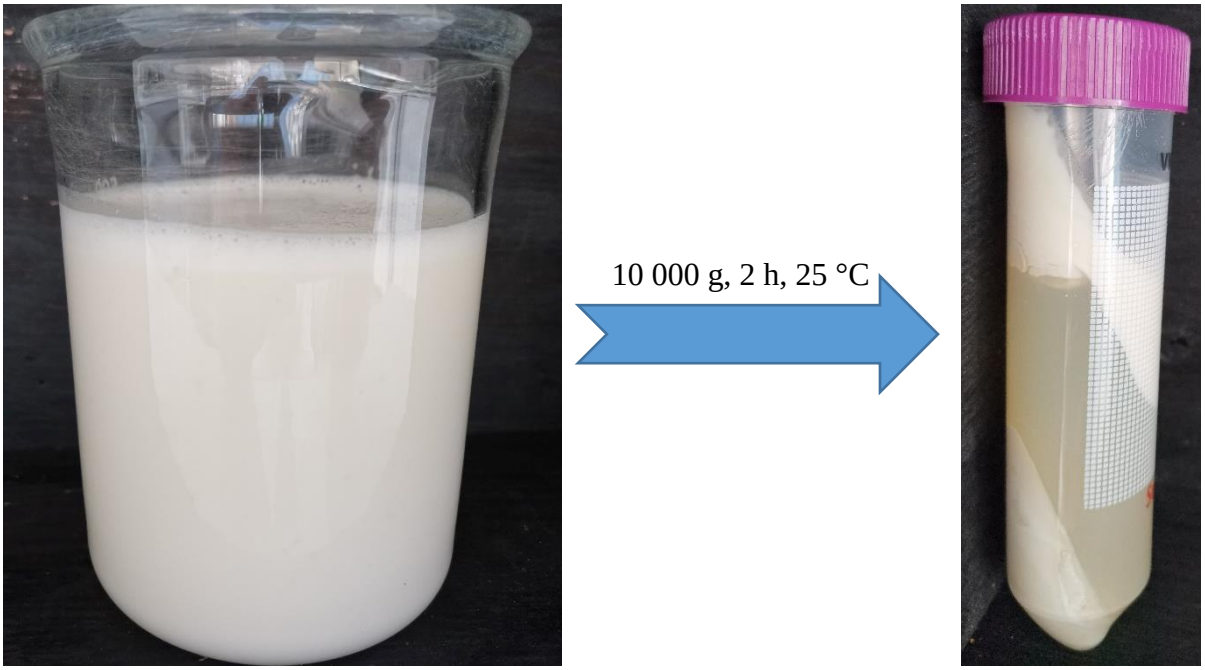


Figure IV.2 : Photo du mix d'arachide préparé à 0,5 mol/L de force ionique avant (à gauche) et après (à droite) une étape de centrifugation à 10 000 g pendant 2 h à 25°C

L'analyse des bilans massiques des différentes fractions extraites à 0,5 et à 0,8 mol/L, rapportées à 100 g de mix et à 100 g de matière sèche du mix, est présentée en figure IV.3.

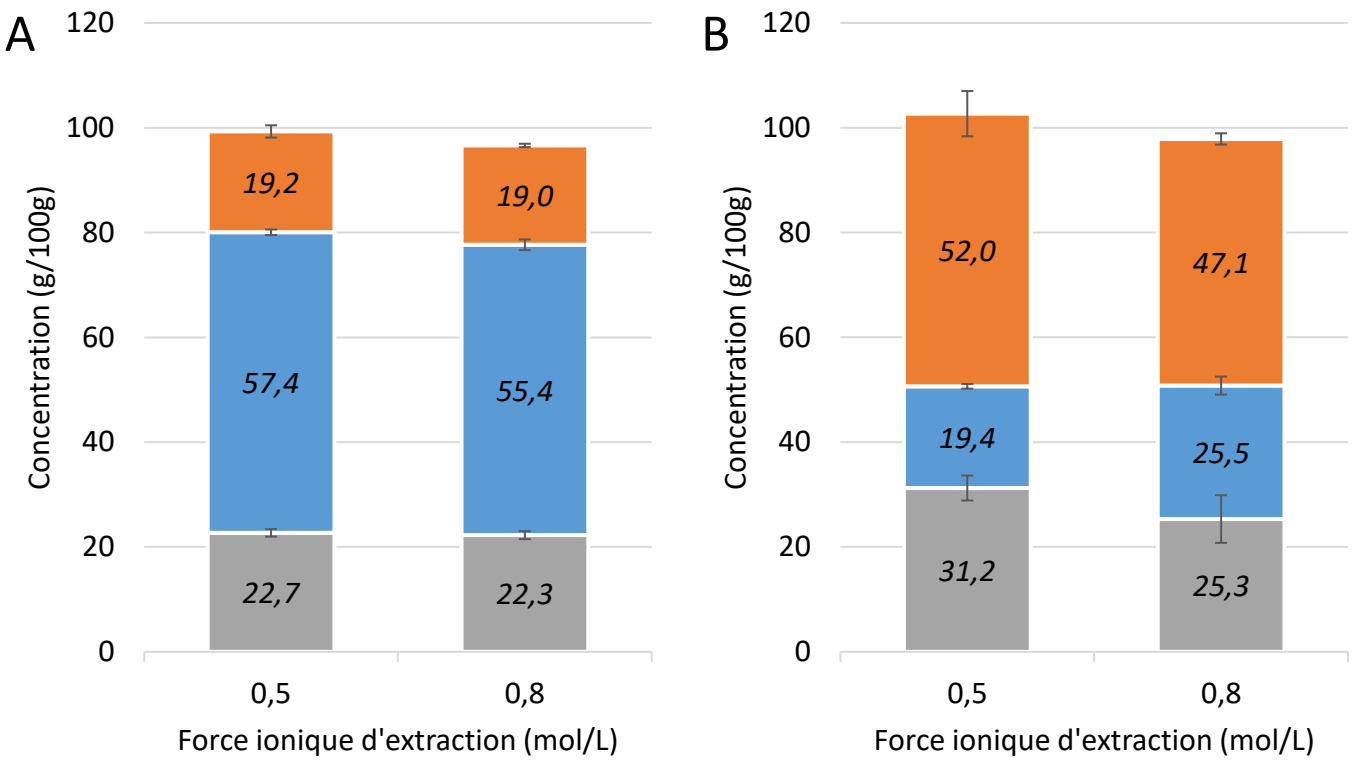


Figure IV.3 : Répartition en masse humide (A) et en masse sèche (B) des différentes fractions du mix d'arachide préparé à une force ionique de 0,5 ou 0,8 mol/L. En orange : surnageant ; en bleu : fraction intermédiaire ; en gris : culot. *fractionnement par centrifugation à 10 000 g pendant 2 h. Les écarts-types sont obtenus par l'analyse de la composition de trois mix différents.*

On constate que le surnageant contient autant de matière sèche lorsqu'il est extrait à 0,5 mol/L qu'à 0,8 mol/L (différence non significative, $p>0,05$). On s'attend à retrouver dans cette fraction les lipides, moins denses que l'eau, qui seraient remontés au cours de la centrifugation à la surface du tube, par gravité. La matière sèche associée au surnageant est en effet de l'ordre de 50 g/100 g, ce qui est très proche de la concentration en lipides de la graine d'arachide. A l'inverse, on constate pour la fraction intermédiaire et le culot des différences selon la force ionique d'extraction, avec une masse sèche 1,3 fois plus importante dans la fraction intermédiaire et réciproquement1,3 fois moins importante dans le culot à 0,8 mol/L qu'à 0,5 mol/L. Une partie des constituants du mix insoluble à 0,5 mol/L se solubilise dans la phase intermédiaire à 0,8 mol/L.

IV.2 Distribution des composants dans les différentes fractions et structure des différentes phases

Les structures des différents constituants du mix et leur répartition dans les différentes fractions ont été étudiées par observation en microscopie, dosage biochimique (pour les lipides et les protéines) et caractérisation granulométrique.

IV.2.1 Répartition des composants dans les différentes fractions

Des images du mix obtenues en microscopie optique sont présentées en figure IV.4. On y observe de nombreux éléments différents, notamment des corps sphériques (de 1 à 20 µm de diamètre, indiqué par des flèches noires) et des éléments informes (de l'ordre de 50-100 µm de longueur, indiqué par des flèches blanches). Lors de la centrifugation, ces éléments se séparent dans les différentes fractions et il est alors plus aisé de les observer et de les identifier.

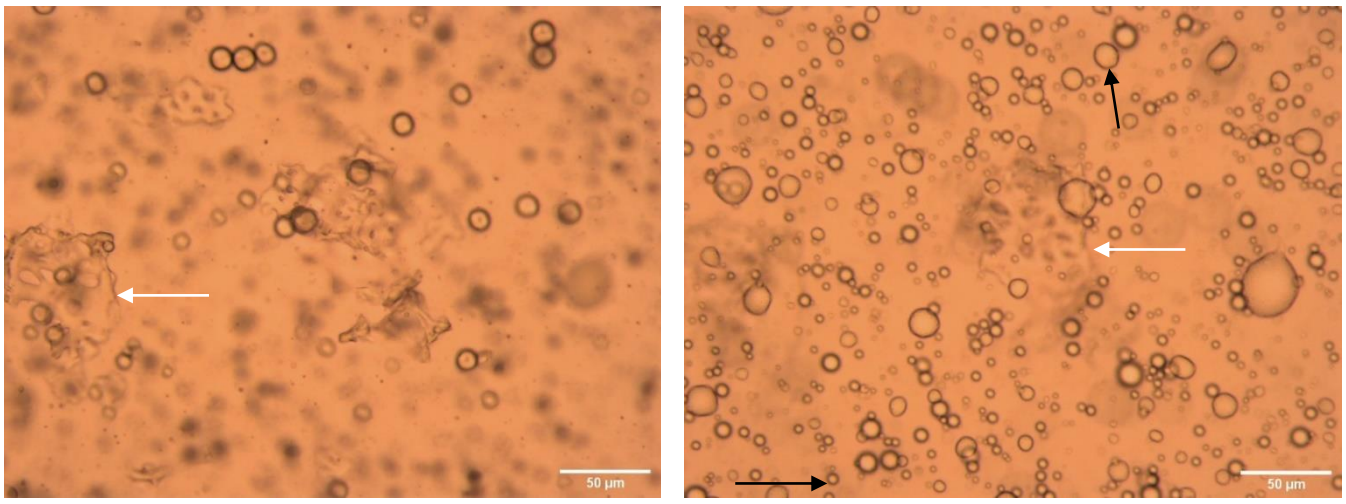


Figure IV.4: Observation microscopique du mix d'arachide préparé à 0,5 mol/L de force ionique. Une même zone est observée à deux focus pour une présentation nette de tous les éléments. Echelle : 50 µm.

Une analyse de la distribution de taille des éléments présents dans les différentes fractions a été effectuée par granulométrie laser (figure IV.5). La phase intermédiaire contient essentiellement des objets de petite taille, de l'ordre de 200 nm, ce qui pourrait par exemple correspondre à des petits agrégats protéiques. Cependant, la précision du modèle de calcul appliqué à cette matrice invite à la prudence sur l'analyse de ce signal, notamment sur des tailles aussi petites car les paramètres optiques sont approximés.

Dans le surnageant comme dans le culot, les tailles d'objets mesurées sont plus importantes que celles observées par microscopie dans le mix. Dans le surnageant, les diamètres équivalents sont majoritairement compris entre 1 et 100 µm, avec trois populations de taille. Les gros objets centrés autour de 10 µm ont une taille largement supérieure à la taille attendue pour des corps lipidiques. Une analyse après dispersion dans du SDS n'a pas montré de différence de taille, suggérant qu'il ne s'agissait pas d'agrégats de corps lipidiques. Dans le culot, la taille des objets est un peu plus importante encore, avec des diamètres équivalents majoritairement compris entre 5 et 500 µm : un pic majoritaire autour de 50 µm et un épaulement vers 500 µm, ce qui pourrait correspondre aux débris cellulaires observés en microscopie. On observe également en épaulement vers 10 µm.

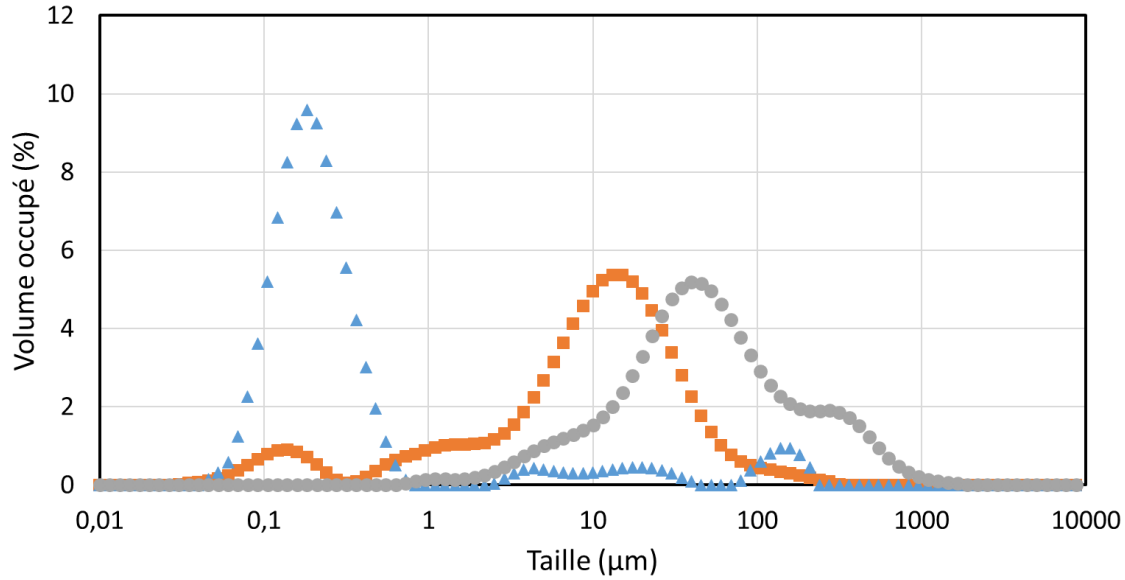


Figure IV.5 : Distribution de taille déterminée par granulométrie laser des constituants présents dans les différentes fractions d'un mix préparé à 0,5 mol/L de NaCl: surnageant (en orange), fraction intermédiaire (en bleu) et culot (en gris)

De même que pour le mix, les compositions biochimiques des différentes fractions obtenues à 0,5 et à 0,8 mol/L ont été mesurées. Le résultat est présenté en tableau IV.2 :

Tableau IV.2 : Répartition en masse humide et sèche des différents constituants du mix dans les trois fractions séparées à 0,5 mol/L de NaCl et à 0,8 mol/L

	Masse humide (g/100 g)		**Masse sèche (g/100 g)**	
	0,5 mol/L	0,8 mol/L	0,5 mol/L	0,8 mol/L
SURNAGEANT				
Eau	18,2±1,8	22,5±1,7		
Protéines	2,0±0,2	2,9±0,1	2,4±0,2	3,7±0,2
Lipides	77,0±1,4	74,1±1,0	94,1±1,8	95,4±1,4
Autres	2,9±3,3	0,6±2,8	3,5±1	0,9±0,5
FRACTION INTERMEDIAIRE				
Eau	89,8±0,5	85,7±1,3		
Protéines	3,6±0,1	6,6±0,4	35,2±1,9	45,8±2,2
Lipides	0,2±0	0,2±0,1	2,4±0,2	1,5±0,2
Autres	6,4±0,7	7,6±1,8	62,4±1,1	52,7±1,4
CULOT				
Eau	58,4±1,3	64,7±4,7		
Protéines	12,3±0,9	8,9±0,3	29,4±2,1	25,6±2,3
Lipides	7,4±0,3	7,5±0,1	17,8±0,2	20,8±3,1
Autres	22,0±2,4	18,9±8,0	52,8±1,3	53,7±4,4

Les masses «autres» sont calculées par soustraction des fractions massiques de la masse totale. Elles correspondent à la masse de mix non identifiée comme protéines, lipides ou eau+ la masse de matière perdue lors du fractionnement. Les écarts-types sont obtenus par l'analyse de la composition de trois mix différents.

Ces résultats montrent que la concentration en protéines augmente dans la fraction intermédiaire lorsque la force ionique est augmentée de 0,5 mol/L à 0,8 mol/L. Dans cette fraction, on trouve 1,8 fois plus de protéines et 1,2 fois plus de constituants non quantifiés à 0,8 mol/L qu'à 0,5 mol/L. Si l'on se réfère à la masse de glucides mesurée dans le broyat d'arachide (figure IV.1) et à la composition des glucides de l'arachides en oses simples et oligosides solubles, et en polyoses insolubles dans l'eau (figure I.5), cela correspondrait à 3,9 et 4,1 g/ 100 g d'oses solubles que l'on retrouverait donc dans la fraction intermédiaire à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L de force ionique ; et à 18,6 et 18,9 g/100 g (respectivement à 0,5 et 0,8 mol/L) de polyoses insolubles que l'on retrouverait dans le culot. Si on calcule la masse de NaCl dans les fractions d'après sa concentration initiale dans le mix et la masse d'eau dans chaque fraction et qu'on l'additionne à cette masse de glucides ainsi qu'aux masses mesurées de protéines et de lipides, on retrouve la masse sèche totale de la fraction intermédiaire (±1,0 g/100 g à 0,8 mol/L), dans les deux conditions de force ionique. Pour le culot, cette addition des masses calculées de NaCl et de polyoses insolubles et mesurées de protéines et de lipides correspond également bien à la masse sèche totale du culot (±2,8 et ±0,5 g/100 g à 0,5 et 0,8

mol/L). Compte tenu de la variabilité de chacune des mesures (matière sèche, protéines et lipides), l'hypothèse selon laquelle les oses simples et oligosides sont retrouvés dans la fraction intermédiaire et les polyoses dans le culot après centrifugation semble donc cohérente.

Parallèlement, on constate que la quantité de protéines présentes dans le culot est plus faible lorsque la force ionique augmente (8,9 g/100 g à 0,8 mol/L, contre 12,3 g/100 g à 0,5 mol/L), ce qui est cohérent avec l'hypothèse de leur solubilisation dans la phase intermédiaire. De façon générale, le culot est majoritairement (à plus de 52 %) composé de constituants qui ne sont ni des protéines, ni des lipides.

Comme anticipé, le surnageant est constitué très majoritairement de lipides, ils représentent plus de 74 % de la masse du surnageant. Leur proportion n'est pas impactée par la force ionique d'extraction. La répartition massique des constituants « autres » (qui inclus à la fois les constituants non mesurés par les dosages effectués et ceux perdus lors du fractionnement du mix) n'est pas non plus impactée par la force ionique d'extraction.

La fraction intermédiaire constitue la phase continue du mix, elle contient l'eau et les constituants solubles. On peut donc supposer que l'eau mesurée dans le surnageant et dans le culot est en réalité de la fraction intermédiaire piégée lors du fractionnement.

IV.2.2 Etude du surnageant

L'observation du surnageant en microscopie classique et par épifluorescence permet de confirmer que le surnageant est constitué essentiellement de corps lipidiques (figure IV.6). On observe une taille des corps lipidiques de 1-10µm, ce qui confirme les résultats de granulométrie, soit jusqu'à 5 fois la taille de 1-2µm décrite dans la bibliographie pour les oléosomes (Zaaboul et al., 2018). Comme des corps sphériques de même taille sont également observés dans les échantillons avant centrifugation (figure IV.3), il est probable que ce ne soit pas la centrifugation mais la préparation du mix au Thermomix® qui conduise à une coalescence de quelques oléosomes.

Cette prépondérance de corps lipidiques est cohérente avec la composition biochimique précédemment déterminée (tableau IV.2). Il a été confirmé par une analyse externe que les lipides présents dans le surnageant et dans le culot présentaient le même profil en acides gras, avec 80 g/100 g d'acide oléique, 5 g/100 g d'acide palmitique et 5 g/100 g d'acide linoléique pour 100 g de lipides.

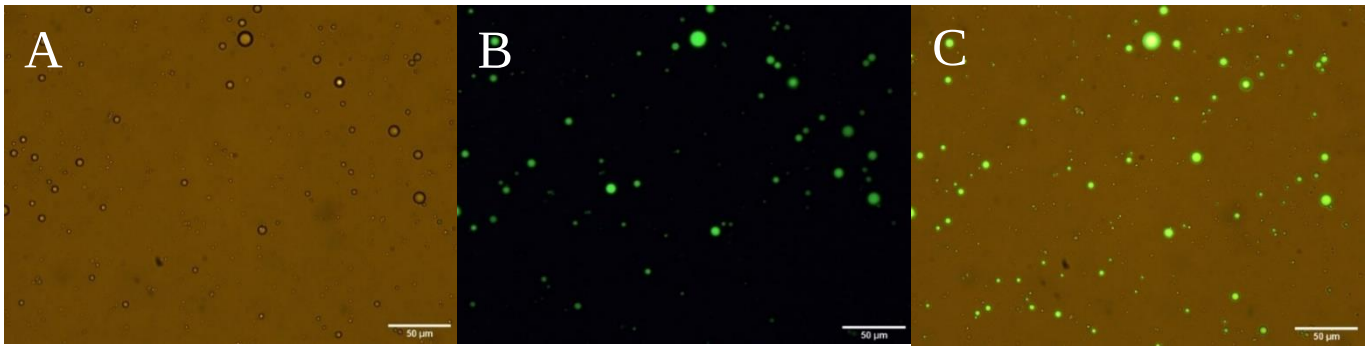


Figure IV.6 : Observation microscopique du surnageant extrait à partir du mix d'arachide centrifugé, préparé à 0,5 mol/L. Le surnageant est dilué au 100ème et observé sous lumière blanche (A), avec un laser à fluorescence avec marquage des lipides (B), et avec utilisation du laser couplé à la lumière blanche (C). Echelle : 50 µm

Ces lipides présents dans la graine d'arachide sont structurés sous la forme de sphérosomes (également appelés oléosomes). Une partie de la masse de protéines mesurées dans le surnageant est donc probablement constituée d'oléosines, qui se trouvent dans la membrane des corps lipidiques (Nikiforidis, 2019; Zaaboul et al., 2018). Il a été démontré que les sphérosomes d'arachide sont constitués pour 98,1 g/100 g de triglycérides, 0,77 g/100 g de phospholipides et 1,27 g/100 g d'oléosines (Jacks et al., 1967). Connaissant la masse de lipides dans le surnageant, on peut donc en déduire la masse de sphérosomes, puis celle des protéines en surface des sphérosomes (équation 19). Il est également possible d'estimer cette masse de protéines en surface en déduisant la masse de protéines quantifiées dans le surnageant de la masse de protéines solubles présentes dans l'eau de cette fraction (équation 20). Le terme « oléosines » sera ici utilisée pour inclure les différentes protéines présentes en surface des sphérosomes, par souci de simplicité.

$$m_{oléosines\ dans\ S} = \frac{m_{lipides\ dans\ S}}{m_{lipides\ dans\ Sph}} \times m_{protéines\ dans\ Sph} \quad (19)$$

$$m_{oléosines\ dans\ S} = m_{protéines\ dans\ S} - \left(\frac{m_{eau\ dans\ S}}{m_{eau\ dans\ I}} \times m_{protéines\ dans\ I}\right) \quad (20)$$

avec S pour surnageant, I pour fraction intermédiaire et Sph pour sphérosomes.

On obtient alors 0,5±0,2 g d'oléosines dans le surnageant selon la première équation et 1,2±0,3 g selon la seconde équation, deux valeurs qui sont indépendantes de la force ionique. Comme la masse de protéines dosée dans le surnageant est de 2,0 et 2,9 g/100 g à 0,5 et 0,8 mol/L, cela suggère qu'une part importante des protéines mesurées dans le surnageant correspond aux oléosines en surface des sphérosomes. Les différences observées dans la mesure du nombre d'oléosines par 100 g de sphérosomes pourraient être dues à la différence de matériel (il s'agit de la variété Virginia dans les

mesures de la bibliographie, et d'une variété Runner dans notre étude) et à la méthode de quantification des protéines (méthode de Folin-Lowry dans l'étude de la littérature et méthode de Kjeldahl dans notre étude.

IV.2.3 Etude de la fraction intermédiaire

La fraction intermédiaire contient les constituants solubles du mix (protéines, glucides simples). Il n'est donc pas possible d'observer ses constituants par microscopie optique. Néanmoins, la fraction étant trouble (figure IV.2), cela suggère la présence d'éléments suffisamment gros pour diffuser la lumière. Il pourrait s'agir d'agrégats protéiques ou de structures hydratées insolubles. La présence de quelques rares globules lipidiques résiduels sont également observés en microscopie, ce qui est cohérent avec la très faible teneur en lipides mesurée (voir tableau IV.2). Comme la masse de lipides mesurée est inférieure à 0,5 g/100 g, nous ferons l'hypothèse que ces corps lipidiques sont représentatifs des limites du fractionnement des trois phases en sortie de centrifugation et non pas de la fraction intermédiaire.

La solubilité des protéines dépend de leur structure ; ainsi, chaque protéine a une solubilité propre qui évolue notamment avec la force ionique. Comme on observe une concentration en protéines solubles qui augmente avec la force ionique (3,6±0,1 g/100 g à 0,5 mol/L, et 6,6±0,4 g/100 g à 0,8 mol/L), on peut supposer que les protéines extraites à 0,8 mol/L ne sont pas les mêmes que celles extraites à 0,5 mol/L. Pour confirmer cela, l'indice d'hydrophobicité de surface (H_0) et les thiols totaux (SH) ont été quantifiés sur les protéines contenues dans la fraction intermédiaire extraite à 0,5 et 0,8 mol/L de force ionique (figure IV.7). Ces deux valeurs tendent à diminuer avec la force ionique, ce qui suggère que la nature des protéines solubilisées évolue avec la force ionique.

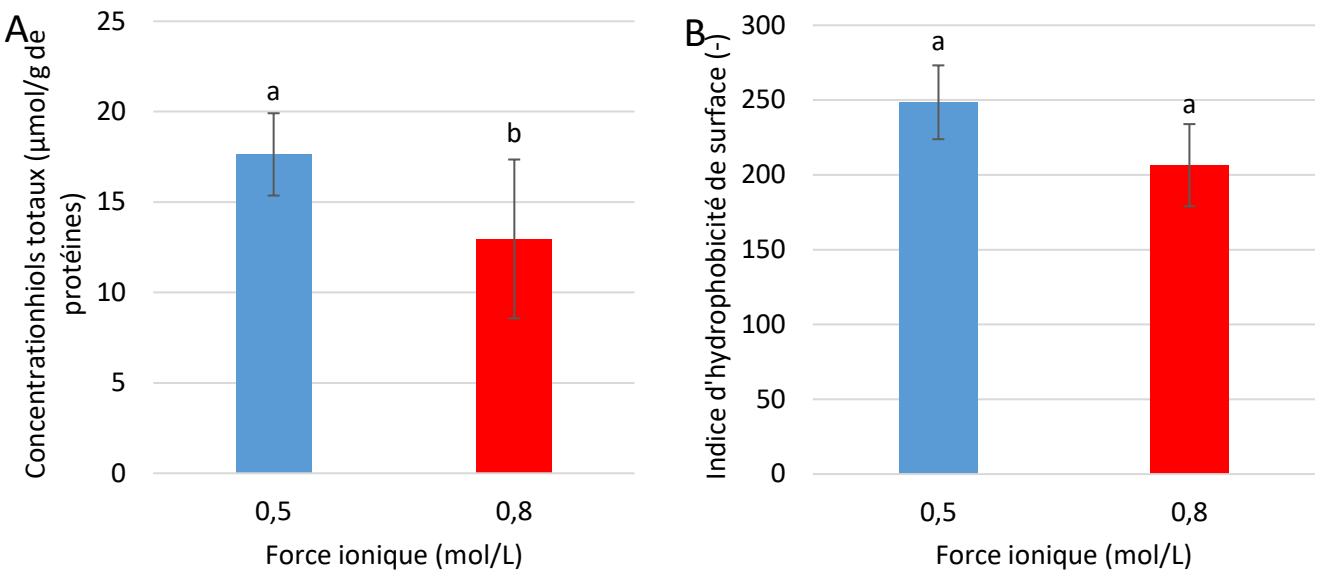
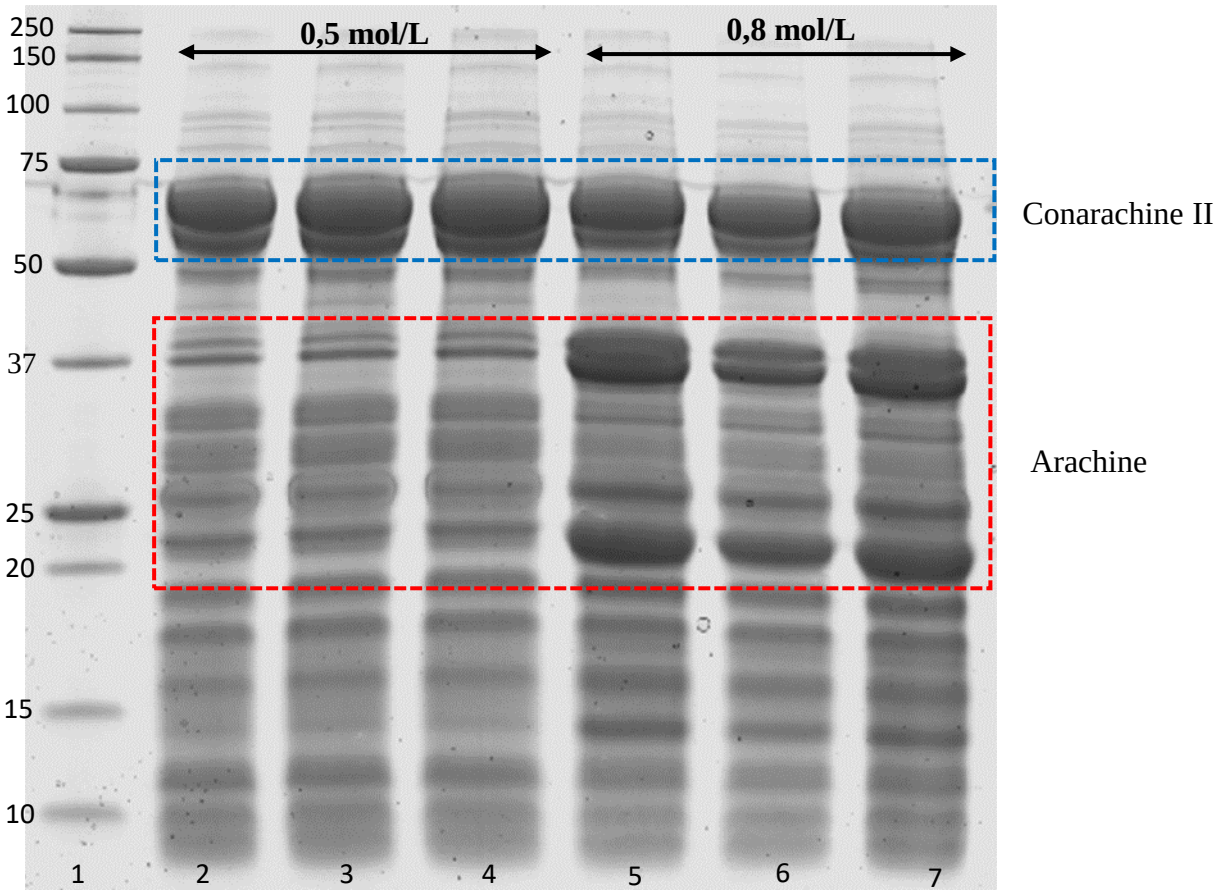


Figure IV.7 : Quantification des thiols totaux (A) et de l'indice d'hydrophobicité de surface (B) des protéines extraites dans la fraction intermédiaire à 0,5 et 0,8 mol/L de force ionique.

Afin d'identifier les protéines extraites lors du fractionnement du mix à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L, une séparation par électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée (figure IV.8 A). On peut identifier les bandes observées à 61 kDa, correspondant à la conarachine, et les bandes observées à 22, 37 et 39 kDa correspondant aux sous-unités basiques (22 kDa) et acides (37 et 39 kDa) de l'arachine (Koppelman et al., 2003, 2001; Wang, 2016). La bande correspondant à la conarachine est plus intense à 0,5 qu'à 0,8 mol/L, et celles correspondant à l'arachine sont plus intenses à 0,8 qu'à 0,5 mol/L.

L'analyse de ce gel par densitométrie permet de quantifier l'intensité de chacune des bandes et d'identifier les différences significatives entre les deux conditions de force ionique (figure IV.8 B). On constate qu'à une force ionique de 0,5 mol/L, l'extrait contient 1,5 fois plus de conarachine, et environ 4 fois moins d'arachine qu'à une force ionique de 0,8 mol/L. On note également la présence d'une protéine de 28,5 kDa, qui est davantage extraite à 0,5 mol/L, mais les données disponibles dans la littérature ne nous ont pas permis de l'identifier.

A



B

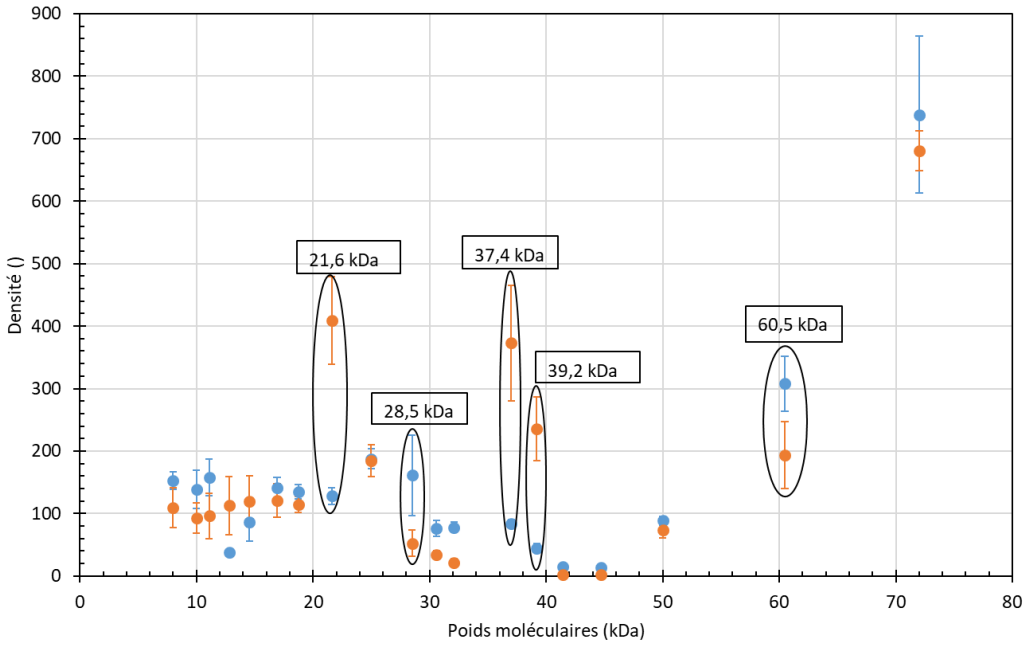


Figure IV.8: A) Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines extraites à 0,5 mol/L (puits 2 à 4 – 3 répétitions) et des protéines extraites à 0,8 mol/L (puits 5 à 7 – 3 répétitions) ; puits 1: marqueur de poids moléculaires. B) Mesure de l'intensité des bandes électrophorétiques SDS-PAGE par densitométrie. En bleu : protéines extraites à 0,5 mol/L. En orange : protéines extraites à 0,8 mol/L. Les bandes au-delà de 80 kDa ne sont pas représentées pour plus de clarté. Elles sont de densité similaire <100 pour les deux conditions. Les différences considérées significatives par un test de Student ($p<0,05$) sont entourées.

IV.2.4 Etude du culot

La fraction appelée culot est une fraction plus complexe dans sa composition. Elle contient principalement de l'eau, mais aussi (par ordre décroissant) des constituants non mesurés par les dosages biochimiques réalisés des protéines et des lipides (tableau IV.2)

On s'attend à retrouver dans les constituants non identifiés les fibres insolubles et les grains d'amidon (5,7g/100g de graine d'arachide (Liu et al., 2016)) car il s'agit d'éléments denses et insolubles . On observe en figure IV.9 que le culot est en fait constitué de quatre sous-fractions d'apparence différentes : une première (C1) en surface du culot, de couleur brune, une seconde (C2) majoritaire en volume, de couleur blanche, une troisième (C3) liquide, de consistance et couleur semblable au miel, et une quatrième (C4) granuleuse et de couleur blanche. Cette fraction C4 est également susceptible d'être divisée en sous-fractions, mais il n'a pas été possible de les séparer efficacement.

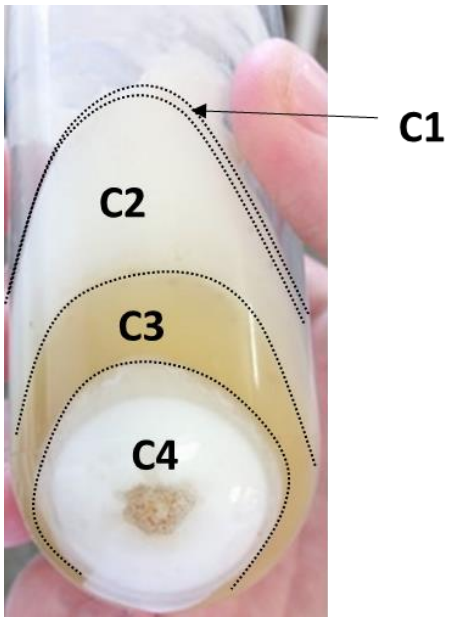
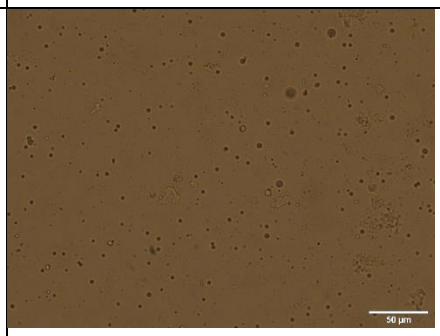
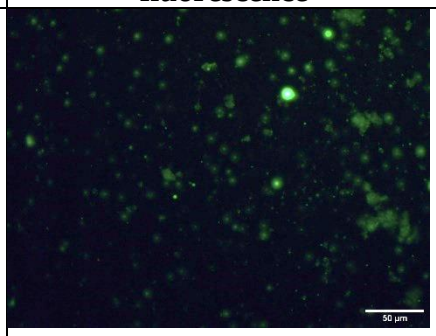
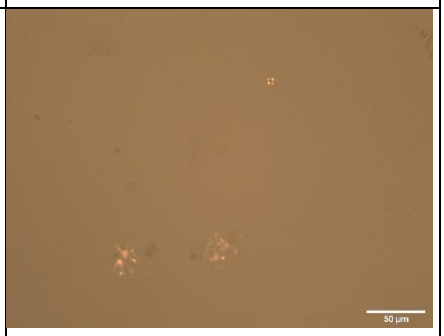
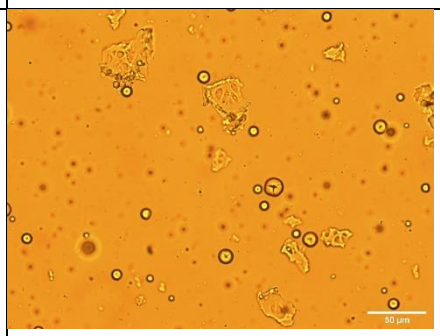
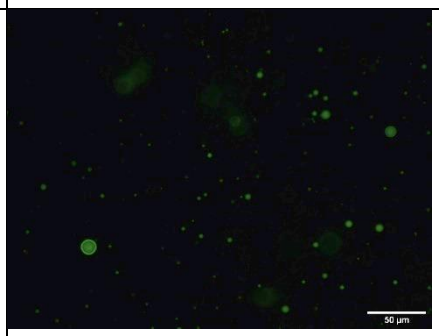
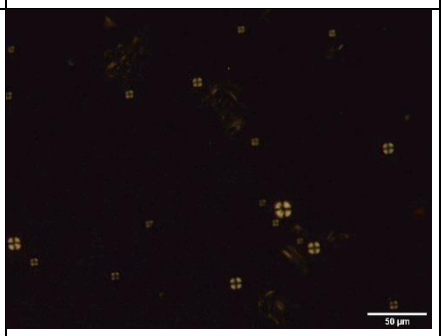
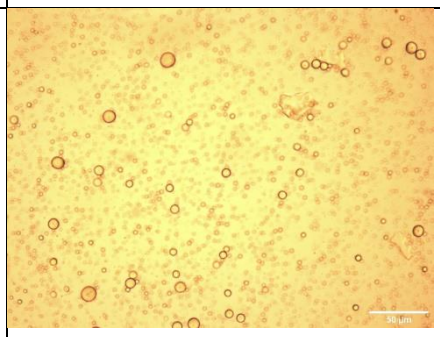
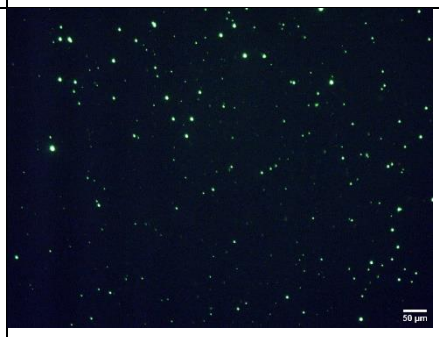
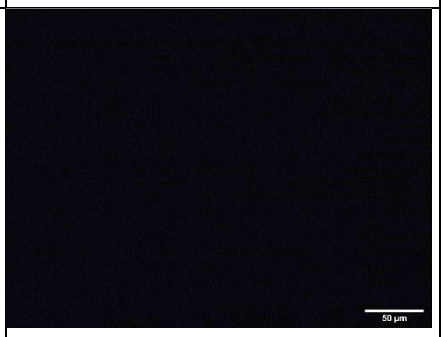
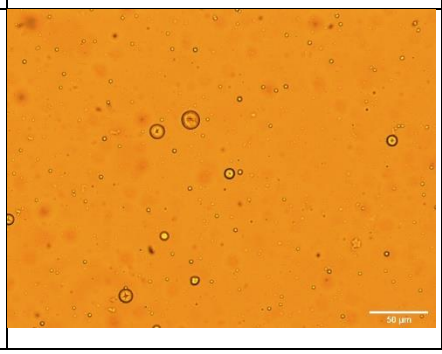


Figure IV.9 : Photographie du culot obtenu après centrifugation à 10 000g pendant 2 heures du mix d'arachide préparé à 0,5 mol/L de force ionique

Lors de l'observation de ces différentes fractions au microscope optique à fluorescence (tableau IV.3), avec un marquage des lipides (en vert fluorescent sur l'image), on remarque que les fractions C1 et C3 contiennent une quantité significative de lipides sous formes de gouttelettes, un élément que l'on retrouve également en moindre quantité dans les autres fractions. Les fractions C2 et C4 sont riches en amidon, comme le montrent les photos prises en lumière polarisée (le motif de croix de malte est représentatif de l'amidon natif). La taille des granules observés est de 5-15µm, comme décrit dans la bibliographie pour la graine d'arachide (Young and Schadel, 1990a). Enfin, la fraction C2 contient également des débris cellulaires informes de 20-50 µm de diamètre. Ces débris ont pu être observés

de façon très ponctuelle (1-2 occurrences par observation, jamais plus d'un élément par image) dans les trois autres sous-fractions.

Tableau IV.3 : Observation au microscope optique à fluorescence des sous-fractions du culot (C1 à C4, cf. fig IV.8) extraites à 0,5 mol/L de NaCl, à 10 000 g pendant 2 heures. Les échantillons sont dilués au 100ème. Echelle : 50 µm

Sous-fraction	Observation sous lumière blanche	Observation sous lumière laser avec marquage des lipides par fluorescence	Observation sous lumière polarisée
C1			
C2			
C3			
C4			

Pour la suite de la thèse, le culot sera considéré comme une seule fraction dans un souci de simplicité.

IV.3 Capacité gélifiante de la suspension

On cherche ici à démontrer la capacité de la suspension d'arachide à former un gel. Pour cela, nous avons imposé à la suspension trois procédés connus pour gélifier les protéines et capables de former différents réseaux gélifiés : un traitement thermique, un traitement acidifiant avec de la D-glucono-δ-lactone (GDL) et un traitement enzymatique avec de la transglutaminase (mTG) (Ben-Harb et al., 2018). Nous avons testé ces trois procédés sur des mix préparés à 0,5 mol/L de NaCl et suivi par rhéologie la prise en gel de la suspension. Les conditions expérimentales du traitement thermique (90°C pendant 30 minutes) sont inspirées des travaux de Wang (Wang et al., 2014) sur la gélification de protéines d'arachide. Les conditions de traitement enzymatique (0,3 % p/p mTG chauffée à 45°C pendant 20 min, puis 16h20 à 25°C) sont issues de précédents travaux effectués chez Onyx Développement. Enfin, pour le traitement acidifiant, la concentration en GDL (5 % p/p) a été choisie après un pré-test sur un balayage en concentration de GDL, de 0,1 à 10 % (p/p). Une concentration de GDL à 5 % (p/p) a été choisie, il s'agit de la concentration la plus basse permettant de gélifier le système. Chaque test a été effectué en triplicat, et une courbe type unique est représentée pour chacune des conditions (figure IV.10).

Au cours d'un **traitement thermique**, les modules conservatif G' et dissipatif G" du mix augmentent rapidement, bien avant que la température n'ait atteint la valeur de consigne de 90°C. Le point de gel est souvent défini dans la littérature par le croisement G'=G'' ; ce point est ici observé 5 minutes après le début de la montée en température, la température de l'échantillon étant alors de 38°C. Cette température est inférieure à la température de dénaturation des protéines d'arachide, il semble donc que l'augmentation de module observée sur le mix ne puisse être entièrement attribuée à une agrégation des protéines par dénaturation thermique, comme nous l'avions initialement envisagé. Une fois le traitement thermique achevé et la température revenue à 25°C, on constate la formation d'une structure stable dont les propriétés rhéologiques n'évoluent plus (plateau des valeurs G' et G''), avec un module conservatif supérieur au module dissipatif (G'>G'').

Lors du **traitement enzymatique**, le point de croisement G'=G" est observé après 13 minutes d'incubation à 40°C avec l'enzyme, un temps normalement insuffisant pour former un gel protéique (Clare et al., 2007; Ionescu et al., 2008). Dans ce cas, les valeurs des modules n'ont pas atteint de plateau à l'issue du traitement, ce qui suggère que l'enzyme est toujours active.

Enfin, pour le **traitement acidifiant**, le point G'=G'' est observé dès le début de la mesure, alors que la suspension n'a pas encore eu le temps de s'acidifier. Les modules augmentent toutefois rapidement et la courbe tend vers un plateau proche de celui atteint lors du traitement thermique.

On constate donc que pour ces trois procédés, le point de croisement G'=G'' ne constitue pas le bon critère pour identifier le point de gélification du système. Cela est probablement dû au caractère encombré du système et à la présence de différents composants, ce qui justifie l'étude, présentée dans les prochains chapitres, du rôle de chaque fraction du mix dans les processus de structuration. Un autre critère qui peut être utilisé pour caractériser les cinétiques de solidification du produit consiste à déterminer la vitesse maximale de structuration, qui correspond au maximum de la dérivée de l'évolution du module G' au cours du temps (Grosso and Rao, 1998; Klost and Drusch, 2019; van der Linden and Foegeding, 2009). On observe cette vitesse à 26,6±3,2 min (soit à 78,6±10,4°C) dans le cas d'un traitement thermique, à 42,6±4,6 min pour le traitement enzymatique (lors de l'isotherme à 45°C) et à 120,7±31 min d'incubation avec la GDL (à température ambiante). Comme attendu, les gels thermiques sont plus rapidement formés que les gels acides et enzymatiques. L'effet de la GDL est environ trois fois plus lent que celui de la mTG, cependant il s'agit pour ces deux procédés d'une gélification lente, avec une vitesse maximale de +1 Pa/min, tandis que la vitesse maximale observée pour le traitement thermique est de 10,6 Pa/min en moyenne. En l'absence de chauffage de l'échantillon dans le test de gélification par acidification (test à 25°C), l'évolution du G' est plus linéaire que dans les autres cas. On observe une augmentation continue entre t_0 et t_0+2h30, ce qui correspond à l'acidification lente apportée par la GDL, puis les modules de perte et de conservation tendent vers un plateau. Les paramètres choisis pour chacun des procédés (température imposée, quantité de GDL ou de mTG ajoutée) sont cependant susceptibles d'influencer fortement les cinétiques de structuration. Les observations présentées ici ne sont donc vraies que pour les paramètres exploratoires que nous avons sélectionnés.

Les G' et tan δ obtenus aux termes des 17 heures de traitement sont présentés en tableau IV.4 pour les trois procédés étudiés. Le traitement thermique conduit à la formation de gel aux modules conservatifs les plus élevés ; à l'inverse, les gels obtenus par traitement enzymatique sont les plus faibles. Les valeurs de tan δ (avec tan δ = G''/G') nous renseignent quant à elles sur le caractère viscoélastique du matériau. L'ensemble des gels présente une valeur très inférieure à 1, rendant compte de gels fermes. Les gels formés par acidification se distinguent clairement des deux autres types de gels, avec une valeur de tan δ significativement plus élevée. Dans ces gels, une proportion plus importante de l'énergie apportée au système au cours d'un cycle de déformation est dissipée sous forme visqueuse.

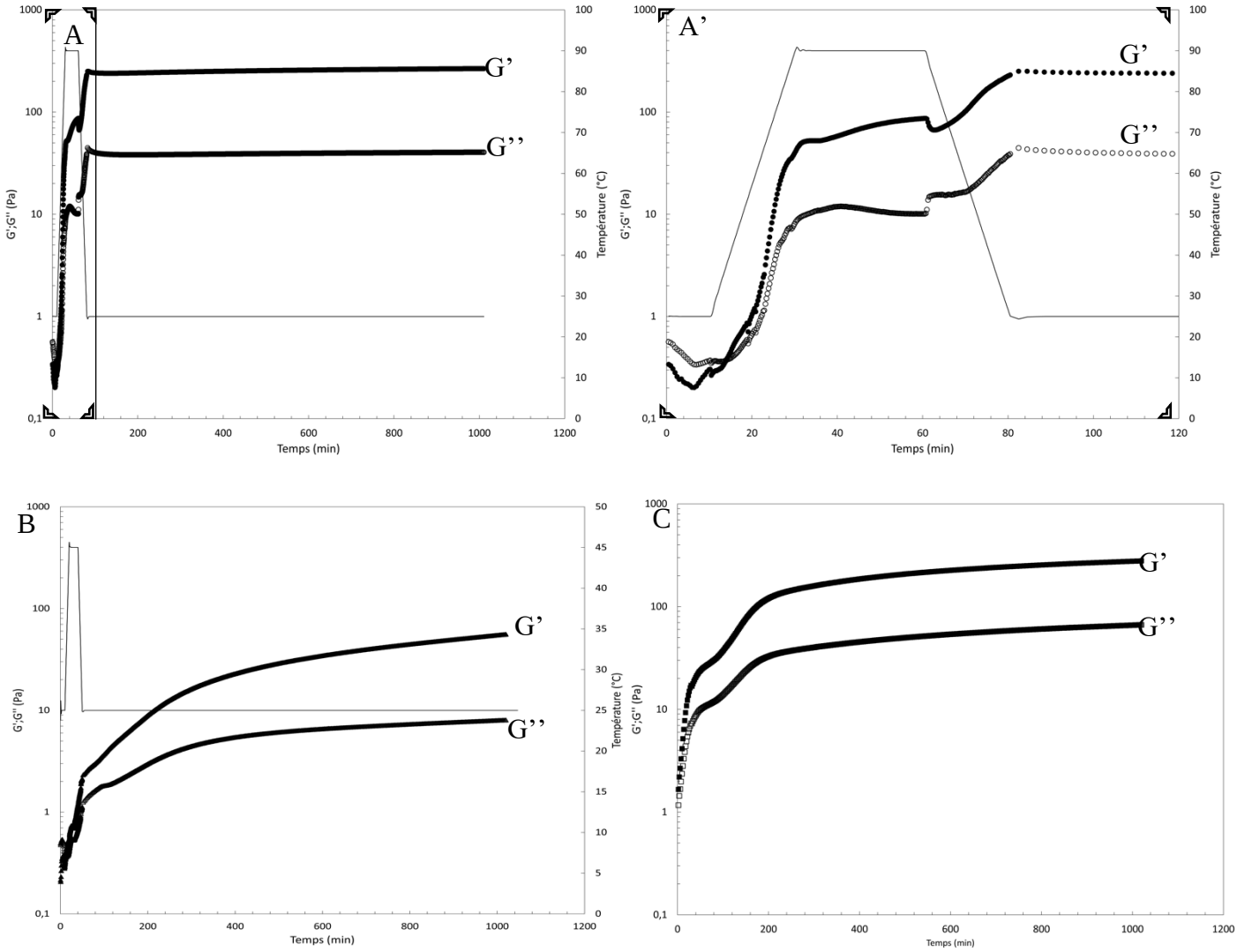


Figure IV.10 : Evolution des modules de conservation G' et de perte G'' de suspensions d'arachide au cours de différents procédés de gélification. Traitement thermique (A), enzymatique (B) et acidifiant (C). L'évolution pendant les deux premières heures du traitement thermique est représentée en haut à droite (A'). La température est représentée par un trait continue (axe de droite).

Tableau IV.4 : Propriétés viscoélastiques des gels après 17 heures de gélification par traitement thermique, enzymatique ou acidifiant

Propriétés	**G' à t_0+17h (Pa)**			**Tan δ t_0+17h (-)**		
Procédés	Thermique	Acidification	Enzymatique	Thermique	Acidification	Enzymatique
Moyenne	335	225	83	0,16	0,24	0,14
Ecart-type	92	106	53	0,01	0,01	0,01

Pour mettre en évidence d'éventuelles différences structurales, les propriétés rhéologiques des gels obtenus ont été caractérisées par un spectre en fréquence puis en déformation (figure IV.11). Leur limite de linéarité (diminution de la valeur du G' au plateau de 10 %) et seuils d'écoulement

(croisement G'=G'' déterminés lors d'un balayage en amplitude de la déformation) sont présentés en figure IV.12.

L'évolution de la valeur de tan δ au cours d'un spectre en fréquence est présentée en figure IV.11 A. On y observe que la tan δ du gel formé par traitement enzymatique évolue plus rapidement que pour les gels formés par acidification ou par traitement thermique (40 Hz contre 80 Hz), ce qui peut indiquer une différence d'organisation structurelle pour les gels formés par traitement enzymatique. Entre 0,01 Hz et 10 Hz, les modules de conservation des gels présentent pour chaque procédé de gélification une dépendance à la vitesse angulaire de type $G' \sim \omega^x$ (ω en rad/s), avec $0{,}062 \leq x \leq 0{,}067$ pour un gel enzymatique, $0{,}072 \leq x \leq 0{,}074$ pour un gel thermique et $0{,}102 \leq x \leq 0{,}107$ pour un gel formé par acidification.

Au cours d'un balayage en amplitude de déformation (figure IV.11 B), les gels formés par traitement thermique et par acidification présentent un profil similaire. A l'inverse, le gel enzymatique présente une limite de linéarité du domaine viscoélastique deux fois supérieure au gel thermique et deux à cinq fois supérieure au gel formé par acidification (figure IV.12 A). Concernant le seuil d'écoulement, on observe une disparité entre chacun des procédés, avec un seuil à 30 % pour un traitement thermique, 50 % pour un traitement acidifiant et 90 % pour un traitement enzymatique (figure IV.12 B).

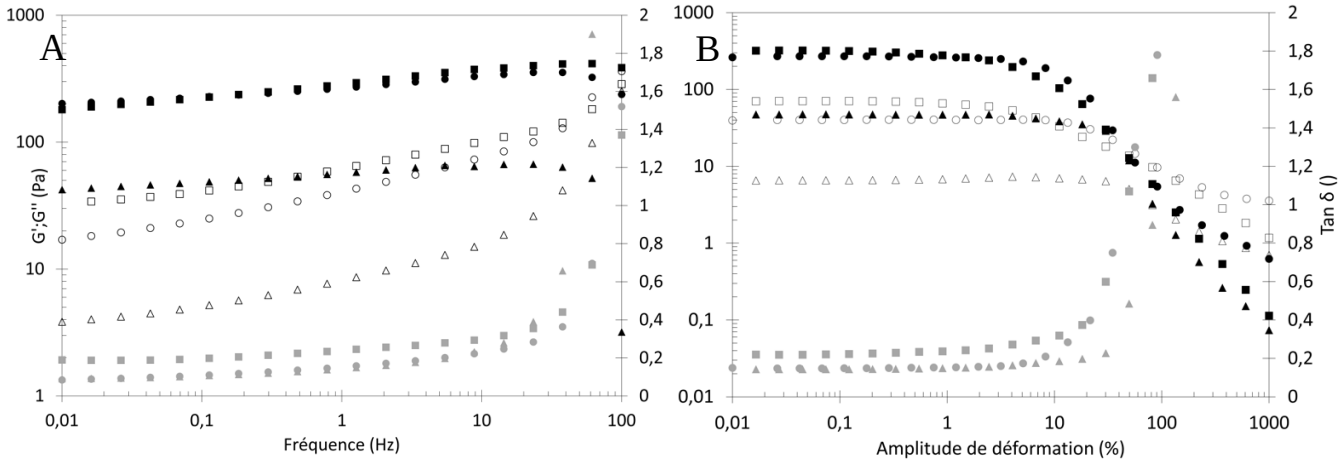


Figure IV.11 : Spectre en fréquence (A) et en déformation (B) de suspensions d'arachide gélifiées par traitement thermique (•), enzymatique (▲) et par acidification (▪). G' : symboles pleins ; G'' : symboles vides ; Tan δ : Symboles gris

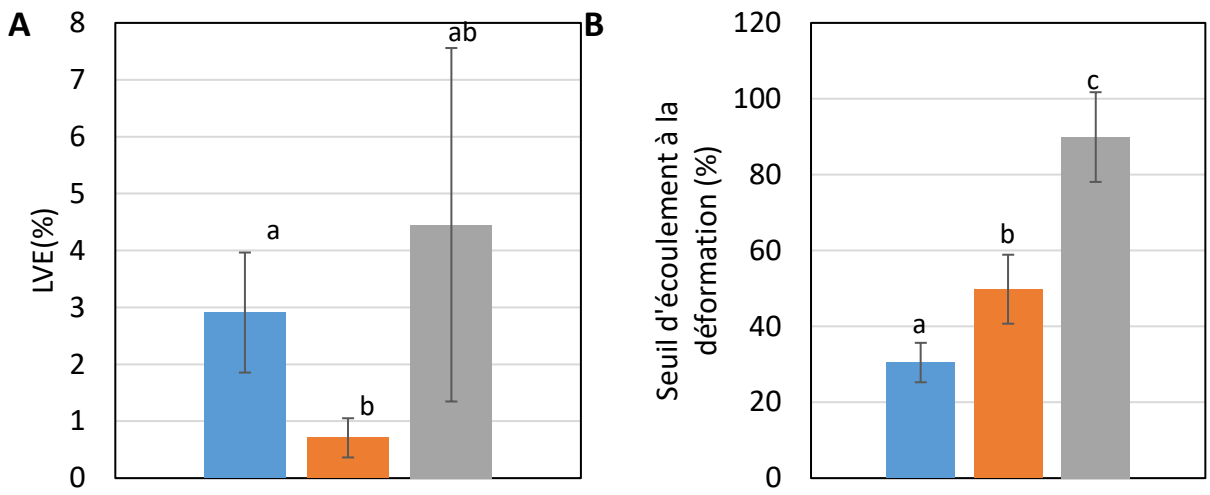


Figure IV.12 : Limite de linéarité viscoélastique (A) et Seuil d'écoulement à la déformation (B) de gels formés à partir d'une suspension aqueuse d'arachide par traitement thermique (en bleu), traitement acidifiant (en orange), et traitement enzymatique (en gris).

Chacun des gels présente donc des propriétés distinctes, qu'il s'agisse du module élastique, de la dépendance à la fréquence ou de la résistance à la déformation (ou point d'écoulement), ce qui permet de distinguer chacun des procédés les uns des autres. Ces propriétés sont bien entendu dépendantes des conditions expérimentales que nous avons choisies. Elles sont néanmoins cohérentes avec les tendances qu'on retrouve dans d'autres travaux de gélification de protéines, notamment dans des systèmes encombrés (Ikeda et al., 1999; Muller et al., 1991; Pons et al., 1993).

Les propriétés physiques des gels thermiques de protéines globulaires étant connues pour être sensibles à la cinétique de montée en température (Kella, 1989; Mession et al., 2013; Sun and Arntfield, 2010), nous avons souhaité évaluer dans quelle mesure cette cinétique était susceptible de modifier les propriétés de ces gels. Les profils de gélification et de spectres en fréquence obtenus étant similaires à ceux présentés, seules les valeurs finales sont indiquées dans le tableau IV.5. On observe une tendance à former des gels plus élastiques lorsque la montée et la descente en température sont plus rapides, comme déjà observé sur d'autres gels (Stading et al., 1992). De plus, le facteur de perte (tan δ) de chacune des conditions est très proche (±0,04). Les vitesses maximales de structuration sont observées à des temps décroissants lorsque la vitesse de chauffe est plus rapide.

On constate cependant que si la modification de la vitesse de montée et descente en température (dans la gamme testée) affecte les propriétés du gel, elle ne transforme pas les résultats à l'égard des observations précédentes : le gel thermique demeure plus élastique que les gels formés par traitement à la GDL ou à la mTG. La vitesse maximale de structuration est observée plus tard pour une cinétique de température plus lente, mais demeure plus élevée que pour les traitements acidifiants et

enzymatiques (respectivement 1,9 et 12,1 Pa/min pour les conditions de cinétique de température 0,2°C et 10°C/min), contre une vitesse maximale de 1 Pa/min pour les traitements acidifiant et enzymatique. La limite de linéarité viscoélastique (LVE) ne change pas non plus en regard des valeurs observées pour des gels acide et enzymatique. En revanche, le seuil d'écoulement à la déformation peut être plus élevé que celui mesuré sur des gels acides lorsque le gel thermique est formé avec des cinétiques lentes de montée et descente en température.

Tableau IV.5 : Propriétés rhéologiques de gels thermiques de mix formés à 0,5 mol/L de NaCl à différentes vitesses de montée et descente en température

Propriétés		**Vitesse de montée et descente en température** (°C/min)			
		0,2	**0,5**	**1**	**10**
G'₀ (Pa)		230	240	280	310
Tan δ (-)		0,147	0,145	0,182	0,161
Vitesse maximale de structuration (Pa/min)		1,9	2,5	9,1	12,1
Condition du système à la vitesse maximale de structuration	(°C)	90	90	90	56,4
	(min)	333	143	77	14
Limite de linéarité viscoélastique (% de déformation)		4	5	2	2
Seuil d'écoulement (% de déformation)		64	61	31	25

Pour la suite de la thèse, la décision a été prise de se concentrer sur l'étude de deux procédés, pour des raisons de temps et de cohérence industrielle. Nous nous sommes orientés d'une part vers le procédé enzymatique, qui a fait l'objet d'un brevet par l'entreprise et que celle-ci souhaite valoriser, et vers le procédé thermique, qui permet de fabriquer des gels très rapidement, tout en ayant potentiellement un intérêt sanitaire (contribution à l'élimination de microorganismes potentiellement présents). Les procédés acides n'ont pas été étudiés plus avant, notamment car en industrie agroalimentaire, l'acidification est généralement induite par la présence de bactéries, dont la maitrise est relativement complexe. Le procédé enzymatique étant très long, nous avons décidé de limiter sa durée à 3 heures, puis d'imposer un traitement thermique, permettant d'inactiver les enzymes. Pour faciliter la comparaison entre les deux procédés, le traitement thermique appliqué après traitement enzymatique est réalisé dans les mêmes conditions que le procédé thermique seul.

IV.4 Propriétés rhéologiques et structurales d'un gel de suspension d'arachide obtenu par traitement thermique précédé ou non d'un traitement enzymatique

Les paramètres de gélification pour ces deux procédés ont été revus par rapport à la section précédente, après une étude bibliographique ciblée sur les protéines d'arachide qui présentent ces conditions comme optimales pour obtenir un module de conservation élevé (Wang et al., 2014; Wang, 2017, 2016). Les conditions retenues sont les suivantes :

- pour le traitement thermique : 95°C pendant 40 minutes
- pour le prétraitement enzymatique : utilisation de la mTG à 0,3 % (g/100 g de suspension), à 40°C pendant 3 heures.

La suspension est laissée 15 minutes à 25°C avant de chauffer (à 95°C ou à 40°C selon le procédé), et de nouveau 5 minutes à 25°C à la suite du refroidissement après le traitement thermique (cf. figure III.5). Les vitesses de chauffe et de refroidissement sont maintenues à 3,5°C/min car nous avons démontrés que ces conditions étaient efficaces pour former des gels (cette vitesse permet d'arriver rapidement à l'isotherme tout en permettant au gel de bien se former) et aisément reproductible pour la formation de gel en batchs au bain-marie. Un spectre en fréquence, puis un spectre en déformation sont réalisés à la suite de la gélification. La suspension est gélifiée dans des conditions de force ionique de 0,5 mol/L et 0,8 mol/L et toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.

On présente en figure IV.13 des courbes représentatives des profils de gélification obtenus. On constate que les nouveaux paramètres permettent bien d'obtenir un gel, avec un module de conservation supérieur au module de perte et un plateau en fin de traitement thermique puis un second à une valeur plus élevée en fin de refroidissement. On ne distingue pas de différences de cinétique entre les échantillons à 0,5 mol/L et 0,8 mol/L lors d'un traitement thermique seul. Les constituants insolubles à 0,5 mol/L et solubilisés à 0,8 mol/L ne dominent donc pas la gélification du mix par traitement thermique, ni ses propriétés viscoélastiques. Lors de l'application d'un prétraitement enzymatique avec la mTG, on constate des disparités dans l'évolution du G' au cours du temps entre les échantillons 0,5 mol/L et 0,8 mol/L dès le traitement enzymatique (en moyenne, $G'_{0,5} = 4,5 \times G'_{0,8}$ à la fin du traitement enzymatique). Ces disparités sont réduites par la suite lors du traitement thermique, avec $G'_{0,5} = 2,5 \times G'_{0,8}$ en moyenne, à la fin de l'étape isotherme à 95°C.

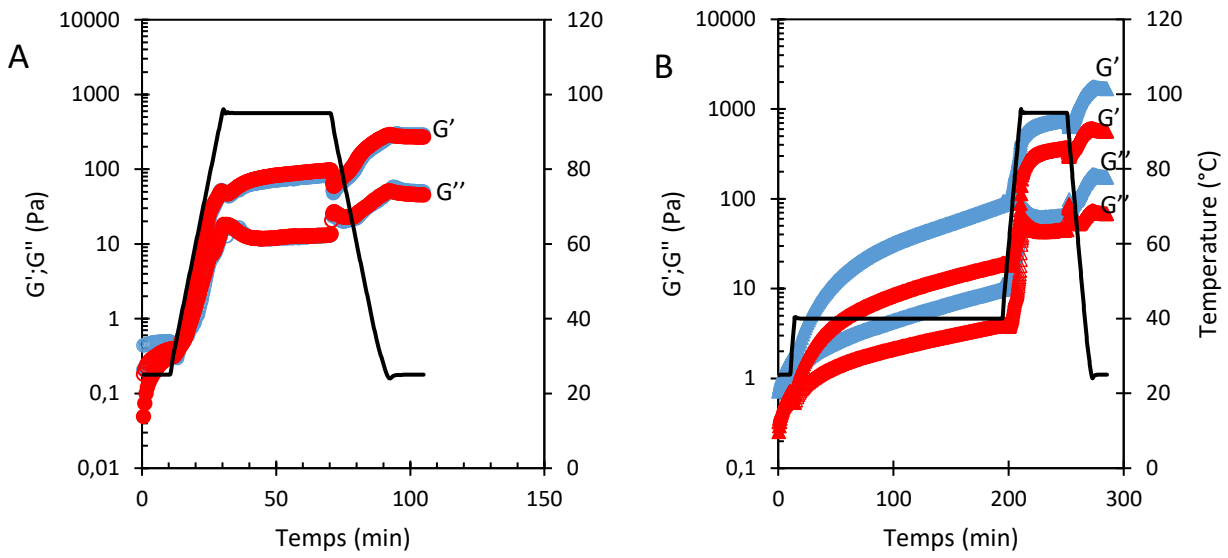


Figure IV.13. : Evolution des modules de conservation G' et de perte G'' de suspensions d'arachide au cours de différents procédés de gélification. (A) Traitement thermique seul et (B) prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique. Les suspensions à 0,5 mol/L de force ioniques sont représentées en bleu et celles à 0,8 mol/L en rouge.

On observe ici encore un croisement G'=G'' à des températures inférieures aux températures de dénaturation des protéines (entre 35°C et 48°C) lors du traitement thermique et après un temps de traitement enzymatique trop court pour gélifier (entre 4 et 6 minutes à 25°C) dans le cas d'un prétraitement enzymatique. On utilisera donc ici la vitesse maximale de structuration pour caractériser les évolutions des suspensions en système gélifié (tableau IV.6). Dans le cas du prétraitement enzymatique, on peut définir deux vitesses maximales de structuration : une première lors du traitement enzymatique, et une seconde lors du traitement thermique. On obtient pour les deux traitements des valeurs de temps et de température auxquelles sont atteintes les vitesses maximales de structuration cohérentes avec la littérature (température supérieure à la température de dénaturation des protéines), et toujours une structuration plus rapide (x100) pour le traitement thermique seul. Comme observé en figure IV.16, il n'y a pas de différences notables dans les gels thermiques formés à 0,5 et à 0,8 mol/L. Concernant les gels enzymatiques, on constate que la vitesse maximale de structuration lors du traitement enzymatique est similaire à 0,5 et à 0,8 mol/L, tandis qu'elle est environ 2 fois plus élevée à 0,5 mol/L qu'à 0,8 mol/L lors du traitement thermique suivant.

Tableau IV.6 : Valeur, température et temps de la vitesse maximale de structuration des gels de suspension de graines d'arachides broyées gélifiées à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L par traitement thermique et par prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique

Vitesse maximale de structuration	Traitement thermique		Prétraitement enzymatique + traitement thermique			
			0,5 mol/L		0,8 mol/L	
	0,5 mol/L	0,8 mol/L	Prétraitement enzymatique	Traitement thermique	Prétraitement enzymatique	Traitement thermique
Valeur (Pa/min)	13,1±6,1	10,7±3,9	0,16±0,05	106,8±11,5	0,12±0,7	56±14,4
Température (°C)	86,7±6	90,3±0,4	38,7±2,2	92,9±0,8	40,1±2,2	95±0
Temps (min)	27,6±1,7	28,6±0,1	14,6±1,8	209,6±0,2	16,5±2	210,5±0

On s'intéresse en figure IV.14 aux propriétés des gels à l'issue du traitement. On observe que les nouveaux paramètres utilisés pour le traitement thermique n'augmentent pas de manière significative le module G', qui est de l'ordre de 300 Pa. La similitude des résultats obtenus à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L sur des gels traités thermiquement démontre que la différence en termes de concentration et de nature des protéines solubles ne suffit pas à modifier significativement le module élastique du gel obtenu, ce qui suggère que d'autres composants pilotent également le caractère élastique des gels. Il peut s'agir des lipides dosés dans la suspension ou des autres composants de l'arachide tels que les glucides qui composent la graine (Chung et al., 2013; Dickinson, 2008). La combinaison d'un traitement enzymatique par la transglutaminase et d'un traitement thermique permet d'obtenir un gel avec un G' en moyenne 20 fois supérieur à celui obtenu par traitement enzymatique seul (selon nos premières conditions) et près de 6 fois supérieur à celui obtenu par traitement thermique seul. A l'inverse du traitement thermique seul, on observe pour ce traitement une différence significative ($p<0,05$) entre les gels formés à 0,5 mol/L et ceux formés à 0,8 mol/L : le module élastique des premiers est en moyenne 3 fois supérieur à celui des seconds. Cela suggère que les conarachines solubilisées préférentiellement à 0,5 mol/L contribuent davantage aux propriétés élastiques du gel que les arachines, solubilisées préférentiellement à 0,8 mol/L. Des différences entre procédés sont également observées sur le facteur de perte de tan δ des gels obtenus (figure IV.14 B). La valeur de tan δ des gels obtenus par traitement thermique est indépendante de la force ionique, à l'inverse de celle des gels ayant subi un prétraitement enzymatique, qui demeure plus faible. Cette différence de tan δ suggère que le prétraitement par la transglutaminase modifie donc la structure du réseau, en comparaison au traitement thermique seul. Cette hypothèse est confortée par les différences de LVE et de seuil d'écoulement, qui sont significativement plus élevées lorsqu'un prétraitement enzymatique

est appliqué (figure IV.14 C et D). Cela peut s'expliquer par les liaisons isopeptidiques covalentes formées par action de la transglutaminase. Ces liaisons propres au traitement enzymatique apportent donc au gel des propriétés viscoélastiques et des propriétés de comportement à la déformation différentes du traitement thermique. Les premières sont également fonction de la force ionique, tandis que les secondes en sont indépendantes. L'impact du procédé sur la force du gel obtenu a également pu être confirmé par mesures de texture (annexe III).

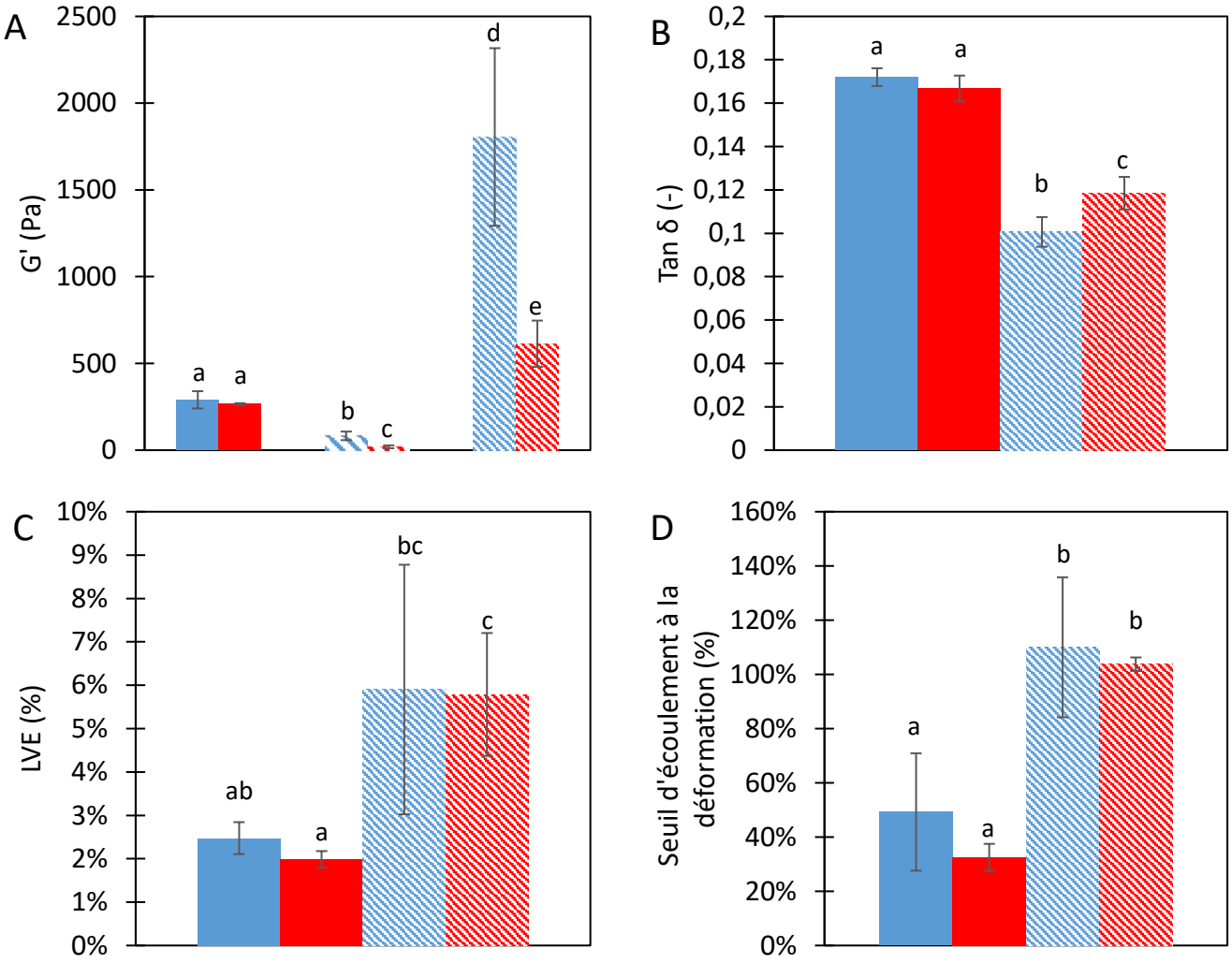


Figure IV.14 : Propriétés rhéologiques des gels de suspensions d'arachide préparés à 0,5 mol/L (en bleu) et à 0,8 mol/L (en rouge) et gélifiés par traitement thermique (barres pleines), avec un traitement enzymatique de 3 h (barres rayées épaisses), et avec ce traitement enzymatique suivi du traitement thermique (barres rayées fines : module de conservation G' (A), facteur de perte tan δ (B), limite de linéarité viscoélastique (C) et seuil d'écoulement (D). La significativité des résultats est présentée suite à des tests de Student effectués sur les 4 échantillons/conditions obtenus. Deux échantillons sont considérés significativement différents pour $p<0,05$.

Des gels ont été également formés, en suivant les mêmes protocoles, dans des tubes en polypropylène placés au bain-marie pour chauffer l'échantillon. Ces gels ont ensuite été observés par microscopie

confocale, avec un marquage des protéines (en vert) et des lipides (en rouge) (figure IV.15). La composition du mix est trop complexe pour permettre une observation nette de la structure du réseau protéique. Un maillage hétérogène a cependant été observé sur l'image de gel formé à 0,5 mol/L, avec prétraitement enzymatique (image en haut à droite). Cette hétérogénéité de l'image semble se retrouver dans l'échantillon à 0,8 mol/L, tandis que la répartition des différents constituants paraît plus homogène dans les gels n'ayant pas subi de prétraitement. Les corps gras marqués en rouge apparaissent de couleur jaune-orangée, ce qui suppose une colocalisation des corps lipidiques avec les protéines (marquées en vert). Certains apparaissent également noirs, mais nous avons pu confirmer qu'il s'agissait de corps lipidiques présents à un autre point focal que celui de l'image. La taille des corps lipidiques, de 1 à 10 µm, est similaire à celle observée dans le surnageant avant gélification. On observe également de nombreux objets amorphes de 5 à 30 µm, il pourrait s'agir de débris cellulaires.

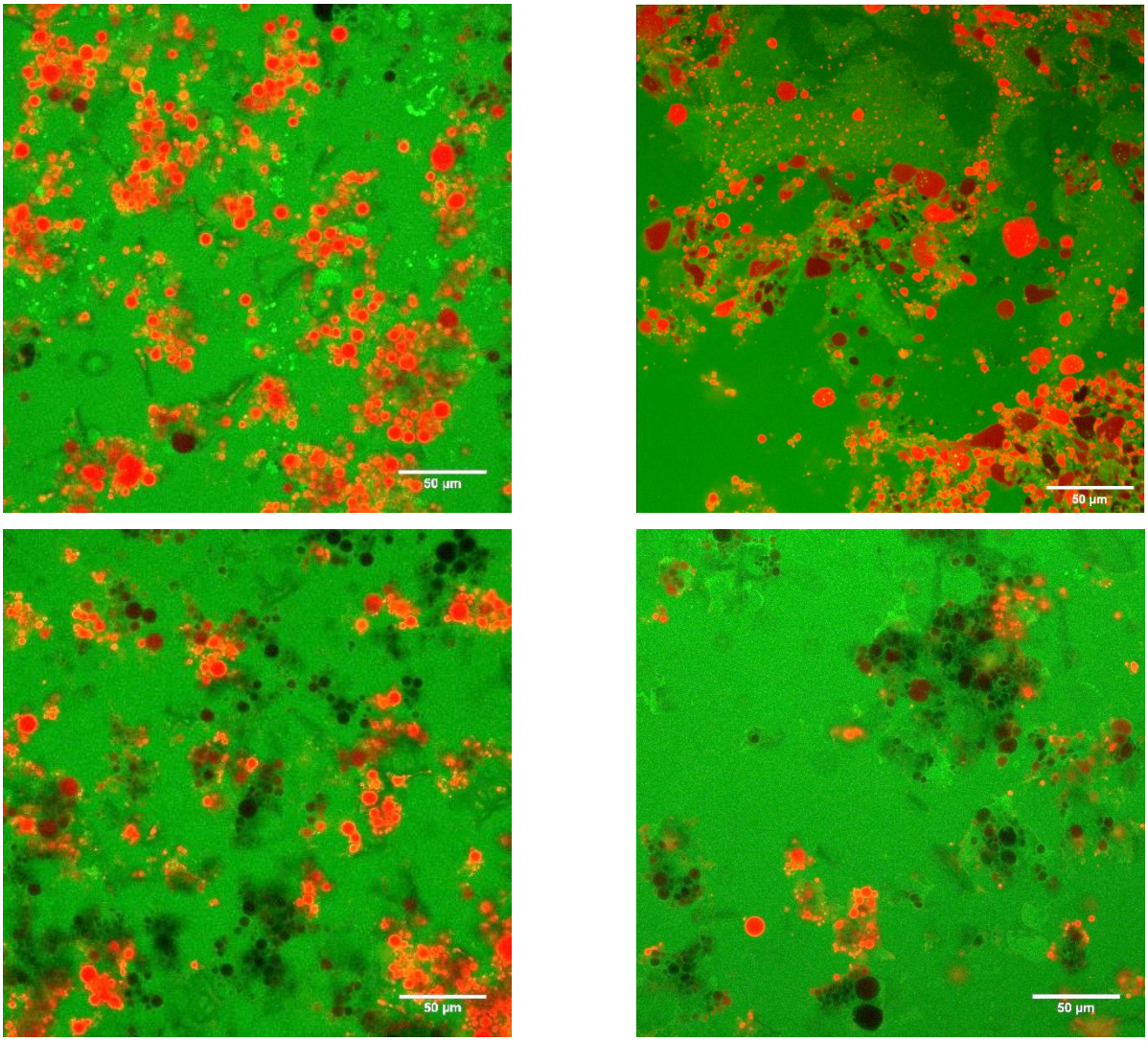


Figure IV.15 : Gels de suspensions de graine d'arachide broyée observés en microscopie confocale, formés par traitement thermique seul (à gauche) ou par traitement enzymatique suivi d'un traitement thermique (à droite), à 0,5 mol/L (en haut) et à 0,8 mol/L (en bas). Echelle : 50 µm

La complexité de la composition du mix rend difficile l'analyse de ces images et l'interprétation des propriétés rhéologiques et nous enjoint à déconstruire le mix pour étudier le rôle de chaque fraction du mix dans la structuration du gel. Nous commencerons par la fraction intermédiaire car elle contient les protéines solubles dont nous avions initialement fait l'hypothèse qu'elles étaient responsables du réseau gélifié initial. Nous étudierons ensuite sa gélification avec le surnageant, puis avec le culot, afin d'étudier la contribution de chacune de ces fractions dans la structure du gel et dans ses propriétés rhéologiques.

Conclusions du chapitre

Le mix formé à partir de broyat de graine d'arachide, d'eau et de sel de table est une matrice complexe composée de **70 g/100 g d'eau**, **13 g/100 g** de **lipides**, de **7 g/100 g** de **protéines** ainsi que de **10 g/100 g de constituants non mesurés**.

Le mix est constitué, de manière simplifiée, de trois fractions qui peuvent être séparées par centrifugation :

- un **surnageant,** principalement composé de **corps lipidiques** sphériques (1-2 µm de diamètre)
- une **fraction intermédiaire**, contenant 90 g/100 g **d'eau** et 10 et 14 g/100 g **de constituants solubles** (protéines et glucides simples), à 0,5 et 0,8 mol/L de force ionique.
- un **culot** composé de divers **constituants insolubles solides** (protéines, amidons, débris cellulaire) ainsi que d'eau (62±5 g/100 g) et de lipides (9 g/100 g)

La force ionique contrôle la quantité de protéines extraite en phase soluble. Il y a 2 fois plus de protéines en solutions à 0.8 mol/L et un ratio arachine/conarachine 6 fois plus important.

Le mix est capable de former des **gels** par **acidification** avec la D-glucono-δ-lactone (GDL), par **traitement enzymatique** avec la transglutaminase microbienne et par **traitement thermique** à 90°C. Ces procédés étant connus pour permettre la gélification de systèmes protéiques, ce résultat suggère fortement le rôle clé des protéines dans le processus de gélification. Ces gels présentent des propriétés rhéologiques différentes ; notamment, les gels formés par voie enzymatique sont plus faibles, dans les conditions étudiées, que les deux autres types de gel.

Nous avons choisi de sélectionner deux procédés pour gélifier le mix : un **traitement thermique seul** et le **même traitement précédé d'un traitement enzymatique à la transglutaminase**. Nous avons montré que ce prétraitement permettait, sur les mix, d'augmenter significativement à la fois le module élastique (dureté du gel) et le seuil d'écoulement des gels (déformation avant la rupture).

L'étude des dynamiques de structuration des gels a montré l'existence de mécanismes de structuration bien avant que l'enzyme n'ait le temps d'agir ou que les protéines ne soient dénaturées dans le cadre d'un traitement thermique, ce qui suggère que **les protéines ne sont pas les seuls constituants impliqués dans la structuration** du produit lors du procédé de gélification.

La **force ionique a un effet sur les propriétés** de mix ayant subi un **prétraitement enzymatique** (G' trois fois plus élevé à 0,5 mol/L qu'à 0,8 mol/L), alors que nous n'avons pas observé d'effet sur les mix n'ayant subi qu'un traitement thermique.

Chapitre V : Gélification et propriétés de gels formés à partir des protéines d'arachide extraites dans la phase intermédiaire

Afin d'identifier et de comprendre le rôle des protéines de la phase aqueuse dans le processus de gélification du mix d'arachide, nous avons étudié leur comportement indépendamment des autres constituants du mix. Nous avons travaillé avec des solutions de protéines extraites dans deux conditions salines et préparées dans une large gamme de concentrations de façon à pouvoir étudier de façon indépendante les effets de concentration et de composition, lesquels varient avec les conditions d'extraction.

La fraction intermédiaire obtenue après centrifugation de mix préparés à différentes forces ioniques (0,5 ou 0,8 M) a été isolée puis lyophilisée. Après remise en suspension des protéines à la concentration désirée, ces solutions sont dialysées dans un bain d'eau de force ionique contrôlée (0,5 ou 0,8 mol/L) pendant 48 heures de façon à imposer la force ionique souhaitée.

La première partie de ce chapitre présente les résultats obtenus sous la forme d'un article scientifique publié dans le journal Food Research International (https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109362, *Combined effects of ionic strength and enzymatic pre-treatment in thermal gelation of peanut proteins extracts*). L'article a été repris tel quel, en anglais. Les conditions « 0,5 mol/L » et « 0,8 mol/L » y sont respectivement référencés en les termes de « 0.5 M » et « 0.8 M ». La deuxième partie du chapitre propose des résultats complémentaires sur les propriétés physico-chimiques et rhéologiques de la fraction intermédiaire et l'impact de l'agrégation enzymatique par la transglutaminase sur les protéines d'arachide. Ces résultats ont été obtenus en parallèle et non présentés dans l'article.

V.1 Effets combinés de la force ionique et d'un prétraitement enzymatique dans la gélification thermique d'extraits de protéines d'arachide

V.1.1 Introduction

Peanut is a worldwide grown legume of high nutritional interest, characterized by a high energy density, about 550 kJ/100 g (Arya et al., 2016). The major components of peanut are lipids (~50wt%), mostly composed of mono-unsaturated fatty acids (ANSES, 2017; Brown et al., 1975) associated with high HDL cholesterol level and improved heart condition (Feldman, 1999). Peanut is also rich in proteins (~25wt%), characterized by an elevated protein amino acid score (PDCAAS), between 0.5 and 0.7 (Suárez López et al., 2006). This value is nutritionally equivalent to the one of animal proteins for human health and proper growth (Arya et al., 2016; Toomer, 2017). Peanut proteins also present functional properties for emulsification, foam formation or gelation (Monteiro and Prakash 1994; Yu et al. 2007).

About 90wt% of peanut proteins are globular proteins, classified into three main families: the arachins, the conarachins I, and the conarachins II (Johns and Jones, 1917; Monteiro and Prakash, 1994). Arachins make up for about 66wt% of the peanut proteins. SDS-PAGE analysis shows the presence of 4 arachins subunits: 3 acidic subunits of 35 kDa, 37 kDa and 42 kDa and 1 basic subunit of 22 kDa (Hu, Zhao, Sun, Zhao, & Ren, 2011). Conarachins altogether make up for about 30wt% of the peanut proteins. Conarachins I (13wt% of the peanut proteins) are contained in the cytosol while conarachins II (16wt% of the peanut proteins) are contained in protein bodies (the aleurones, that also contain arachins). Their composition differ: conarachin I is a trimer composed of small molecular weight polypeptides (18 kDa, 17 kDa, 15,5 kDa), while conarachin II is a trimer of three 64 kDa units (Toomer, 2017).

In solution, globular proteins behave in their native configuration as colloidal objects stabilized by repulsive interactions (Boire et al., 2019). During food processing, thermal treatment enzymatic action or acidification, may result in protein gelation, giving rise to solid-like behaviors associated with appreciated textural properties (Totosaus et al., 2002).

Thermal treatment requires a temperature higher than the protein denaturation temperature, so that proteins unfold and expose their buried hydrophobic amino acid residues. They subsequently aggregate into a percolating network through covalent and non-covalent interactions. For peanut flour

suspensions, a thermal treatment above 90 °C results in gelation, the gels being harder as the flour (and protein) content increases (Davis et al., 2007; Kain and Chen, 2010). Increasing the ionic strength from 0 M to 0.5 M results in "weaker" gels (Schmidt et al., 1978). A pre-treatment of the suspension with transglutaminase delays the gelation during thermal treatment, and results in softer gels (Gharst et al., 2007). A similar behavior is also observed in peanut protein isolate suspensions (Chen et al., 2016; Jiao et al., 2018a).

During enzymatic gelation, protein-protein covalent bonds are formed. For example, the microbial transglutaminase (mTG) forms ε-(ɤ- glutamyl) lysine intra- and inter-molecular bonds (Heck et al., 2013). This procedure was successfully applied on peanut protein isolates (Jiao et al., 2018b). Besides both arachins and conarachins are involved in the gel network, conarachins are more effectively cross-linked by mTG (Feng et al., 2014; Sun et al., 2012).

Acidification also induces gelation through the reduction of repulsive interactions between proteins as the protein net charge decreases. The storage modulus of peanut protein isolate gels formed by acidification follows a power-law behavior as a function of the concentration, that is reminiscent of fractal structures observed on colloidal gels (Bi et al., 2019).

The relatively low cost of peanuts, their interesting nutritional properties and the gelling capacity of their proteins paves the way for the production of new food products. Recent works reported on the formation of solid-like structures by processing grinded peanuts suspensions with transglutaminase (Basse et al., 2018; Lorand and Basse, 2018), or by combining a transglutaminase treatment with an heat/high pressure treatment (115 °C, 0.17 MPa) to form tofu-like gels (Guo et al., 2018). Textural properties can be tuned by the nature and amount of proteins solubilized in the aqueous phase, that is ionic-strength dependent, and by the gelation process parameters, but this requires a better understanding of processing-structure relationship.

We investigate here the gelation of protein extracts representative of the protein fraction solubilized when a peanut suspension is grinded in salted (NaCl) water. These extracts are obtained at two ionic strengths, 0.5 M and 0.8 M, to produce suspensions with different conrachins/arachins ratio. We first investigate by rheology the gelation of such suspensions through a thermal treatment at 95 °C, preceded or not by an enzymatic pre-treatment, at the two ionic strengths. Then, gel structure is characterized by confocal microscopy.

V.1.2 Materials & Methods

V.1.2.1 Materials

Dehulled peanuts from a blanched Runner High Oleic variety are bought by bags of 25 kg (Bredabest BV, Netherlands), and stored in plastic containers of 25 kg under vacuum, at 4 °C.

Microbial transglutaminase (EC 2.3.2.13, Activa® EB, activity = 34 U/g) from *Streptoverticillium mobaraense* is supplied by Ajinomoto (Japan).

V.1.2.2 Methods

V.1.2.2.1 Sample preparation

V.1.2.2.1.1 Protein extraction and freeze-drying

Blanched white peanuts are first coarsely grinded for 2-3 min (MC15 grinder from Stephan, Belgium) by batches of about 5 kg. The resulting paste is stored at 4 °C in hermetically sealed containers and used within 4 months. For protein extraction, 295 g of this paste are mixed with 685 g of tap water and 20 or 32 g of sodium chloride (La Baleine Fine Sea Salt, France) to reach an ionic strength (IS) of 0.5 M or 0.8 M, respectively. This suspension is then mixed and finely grinded at room temperature for 15 min at 1100 rpm in a Thermomix TM5 (Vorwerk, Germany), to reach an average particle size of about 25µm.

The suspension is then dispatched in 50 mL centrifuge tubes, and centrifuged at 10 000 g for 2 h (Sigma 3-18K centrifuge from Fisher Scientific, USA). Three fractions were obtained: the supernatant, which contains most of the lipids, the pellet, which contains the insoluble particles, and the intermediate aqueous phase, which contains in particular the solubilized proteins. This intermediate fraction is turbid, suggesting the presence of proteins aggregates or impurities that are not eliminated by centrifugation, however, we choose not to purify further these extracts in order to keep all the solubilized/suspended proteins in the aqueous intermediate phase. The corresponding protein extraction yields, determined with the Kjeldhal method (see below) ranged from 41%±7% w/w (for IS = 0.5 M) to 54%±13% w/w (for IS = 0.8 M) of the total amount of proteins present in the mix. This fraction is collected, frozen at -80 °C, and freeze-dried until complete extraction of the

water (Alpha 2-4 LD_{plus} freeze-dryer from Martin Christ, Germany). Freeze-dried protein powders are stored at 4 °C in sealed containers and used within 2 weeks.

V.1.2.2.1.2 Protein suspensions preparation

Protein suspensions from 4wt% to 16wt% are prepared by batches of 60 mL from the freeze-dried powder dispersed in distilled water under magnetic stirring for 15 min. To ensure constant ionic strength, suspensions are dialyzed in dialysis bags (Spectra/Por, molecular weight cut-off 3 kDa from Spectrum, USA) against a 0.5 M or 0.8 M NaCl solution (renewed three times) for 48 h. Protein suspensions (pH=6.4±0.2) are then collected and weighed to determine the dilution factor and assess their final protein concentration.

V.1.2.2.2 Protein characterization

V.1.2.2.2.1 Protein content

Nitrogen contents in the freeze-dried powders are determined in triplicate on 0.1g of sample, with the Kjeldhal method (Speed Digester K-439 from BUCHI, France), using a protein-nitrogen coefficient of 5.46 (Misra, 2001). The mineralization gradient is 300 °C for 20 min, 400 °C for 20 min, and 520 °C for 90min.

V.1.2.2.2.2 Total free sulphydryl content

Total free sulphydryl content (TFS) is determined in triplicate using Ellman's reagent. Ellman's reagent (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTBN) at a concentration of 4 mg/mL is prepared in an urea Tris-glycine EDTA buffer (8 M urea, 0.086 M Tris, 0.09 M glycine, 4 mM EDTA; pH 8.0). 500 µL of the protein suspension with a protein concentration $C_p \approx$ 5-10 mg/mL are mixed with 2.5 mL of buffer and 20 µL of Ellman's reagent. Samples are gently stirred for 15 min, before absorbance measurement at 412 nm (spectrophotometer Carry 100 UV-VIS, Agilent Technologies, USA). The TFS content is calculated using the following equation (Shen et al., 2017), with D the dilution factor:

$$[SH]_{(\mu mol\ SH\ /\ g)} = \frac{73{,}53\ D\ A_{412}}{Cp} \qquad (21)$$

V.1.2.2.2.3 Surface hydrophobicity

Surface hydrophobicity is determined in triplicate from fluorescence measurements (Shen et al., 2017), with the fluorescent probe 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS). Five protein solutions (of 4 mL) were prepared from 0.0025 % to 0.02% w/v in a phosphate buffer (8 mM, pH 7.0). The

fluorescence intensity is measured after ANS addition (20 µL), for excitation and emission wavelengths of 390 nm and 470 nm, respectively (spectrophotometer Carry 100 UV-VIS, Agilent Technologies USA). The relative fluorescent intensity (RFI) is determined as $RFI = (F - F_0)/F_0$, with F the fluorescence of the protein-ANS conjugate, and F_0 the fluorescence of the ANS probe alone. The surface hydrophobicity is calculated from the initial slope of RFI versus protein concentration.

V.1.2.2.2.4 Protein profile

SDS-Page gel electrophoresis is performed with a Mini-PROTEAN Tetra System, with Mini-PROTEAN TGX gels and Precision Plus Protein Unstained Standards from Bio-Rad (USA). Protein suspensions (C_p=5 µg/µL) are mixed with an equal volume of 2X Laemmli buffer (5% v/v β-mercaptoethanol, 40% v/v glycerol, 12.5% v/v Tris-HCl at 0.5 mol/L (pH=6.8), 20% v/v SDS 10% w/v, 1% v/v of bromophenol blue, and 21.5% v/v distilled water). A volume of 10 µL of sample is then loaded on each lane of the gel. Migration is performed at 200 V in a running buffer composed of 1% w/v SDS, Tris buffer (250 mM) and glycine solution (1.92 M, pH=8.3). After staining with Coomassie brilliant blue R-250 for one hour, gels are thoroughly washed in distilled water and scanned in a GS-800 Calibrated densitometer (Bio-Rad, USA), before image analysis with PDQuest 2-D Gel Analysis Software (v 6-2-1).

V.1.2.2.3 Gelation and gel characterization

Protein suspensions are all submitted to a thermal treatment (95 °C for 40 min), preceded or not by an enzymatic pre-treatment with transglutaminase. Whenever used, transglutaminase is added to the suspension under magnetic stirring for 5 min. Its concentration is always 0.3wt%, as this concentration induces the gelation of grinded peanuts suspensions (Basse et al., 2018). The sample naming is specified in Table V.1. It distinguishes samples based on (i) the applied process (Thermal Treatment, TT or enzymatic + Thermal Treatment, eTT) and (ii) the Ionic Strength during protein Extraction (E) and (after dialysis) during Gelation (G). Due to the different dilution factors observed during dialysis, the lowest and highest protein concentrations (C_p) slightly differ from one sample to another, as indicate in the table.

Table V.1: Classification and protein concentration range (Cp, in g/100g) of the different samples.

Ionic Strength	Gelation process	
	Thermal Treatment only	Enzymatic pre-treatment followed by Thermal Treatment
Extraction and gelation at 0.5 M	$E_{0.5}G_{0.5}$ TT $3.0 \leq C_p \leq 13.5$	$E_{0.5}G_{0.5}$ eTT $3.0 \leq C_p \leq 13.5$
Extraction and gelation at 0.8 M	$E_{0.8}G_{0.8}$ TT $3.4 \leq C_p \leq 12.1$	$E_{0.8}G_{0.8}$ eTT $3.4 \leq C_p \leq 12.7$
Extraction at 0.5 M and gelation at 0.8 M	$E_{0.5}G_{08}$ TT $3.0 \leq C_p \leq 7.8$	$E_{0.5}G_{0.8}$ eTT $3.1 \leq C_p \leq 7.8$
Extraction at 0.8 M and gelation at 0.5 M	$E_{0.8}G_{0.5}$ TT $3.2 \leq C_p \leq 10.3$	$E_{0.8}G_{0.5}$ eTT $3.2 \leq C_p \leq 9.3$

V.1.2.2.3.1 Rheological characterization

Rheological tests are performed with a stress-controlled rheometer Physica MCR 301 (Anton Paar, Austria) in a Couette cell (sample volume = 25 mL, gap = 1 mm) equipped with a Peltier temperature controller. Gelation is monitored *in situ* under a constant oscillatory strain $\gamma = 1\%$ and at a constant frequency f = 1 Hz. Prior tests ensured that such low oscillatory strain did not affect gelation and remain in the linear regime for the final gel characterization. Whatever the gelation process, the suspension is first maintained for 5 min at 25 °C. For samples submitted only to a thermal treatment (TT), the temperature was then increased to 95 °C at a rate of 3.5 °C/min, then hold at 95 °C for 40 min, before being decreased to 25 °C at a rate of 3.5 °C/min. For samples submitted to an enzymatic pre-treatment (eTT), the temperature was increased to 40 °C at 3.5 °C/min, and held for 3 h at 40 °C: at this temperature, the enzymatic activity is about 60% and is stable over time (supplier's data). Then, the temperature evolution follows the TT procedure. Once gelation is achieved, a frequency sweep is performed at a strain $\gamma=1\%$, from f=0.01 Hz to f=100 Hz, followed by a strain sweep from $\gamma=0.01\%$ to 1000% (f=1 Hz).

V.1.2.2.3.2 Confocal Laser Scanning Microscopy (CSLM)

Confocal images are obtained with a TCS SP8 AOBS inversed confocal microscope (Leica, Solms, Germany) equipped with a helium-neon laser (458 nm excitation wavelength) and an argon laser (633 nm excitation wavelength). Protein labelling is performed with the commercially available chromophore DyLight 488 nm prepared at 0.5 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA). Fragments of the gels are sampled with a spatula and laid on a 2µL drop of chromophore before observation.

V.1.3. Results and discussion

V.1.3.1 Protein extracts characterization

The protein concentration in the freeze-dried protein powders varied from batch to batch, from 35wt% to 49wt% and from 43wt% to 50wt% when extraction was conducted at 0.5 M and 0.8 M, respectively. In each batch, local heterogeneities were observed, therefore, for each suspension, C_p is determined based on the protein content of the single batch used for its preparation.

The protein composition of the two extracts at 0.5 M and 0.8 M determined by electrophoresis showed 25 bands, from 8 kDa to 250 kDa, assigned to the different subunits of conarachins and arachins as depicted in Figure V.1. The band at 64 kDa, attributed to conarachins subunits (Toomer, 2017) is 1.6 times more intense in the proteins extracted at 0.5 M (lanes 2-4) than in the ones extracted at 0.8 M (lanes 5-7). In the opposite, the bands at 22 kDa, 37 kDa and 39 kDa, attributed to arachins subunits, are 3 to 5 times more intense in the samples extracted at 0.8 M (lanes 5-7) than in the ones extracted at 0.5 M (lanes 2-4). The conarachins/arachins ratio is therefore ∼5-8 times larger in the 0.5M extract than in the 0.8 M extract, which is consistent with previous results (Monteiro and Prakash, 1994). Considering this large difference, in the following, the 0.5 M extract will be named the conarachins-rich extract, and the 0.8 M extract the arachins-rich extract.

Thiol group content and surface hydrophobicity are relevant characteristics to assess proteins ability to form disulfide bond and interact through hydrophobic interaction, respectively. As conarachins have 2-3 times more sulfur-containing amino acid than arachins (Brown, 1942; Wang, 2017), it is expected that the conarachins-rich sample (0.5M extract) contains a higher amount of thiol groups. Indeed, the thiol content of the 0.5 M extract is 17.6±2.3 µmol/g, against 11.5±2.0 µmol/g for the 0.8 M extract, these values being close to the one recently determined on Peanut Protein Isolate (Sun et al., 2018). By contrast, surface hydrophobicity is not significantly different between the two extracts: 248±24 (AU) and 206±27 (AU) for the 0.5 M and 0.8 M extracts, respectively.

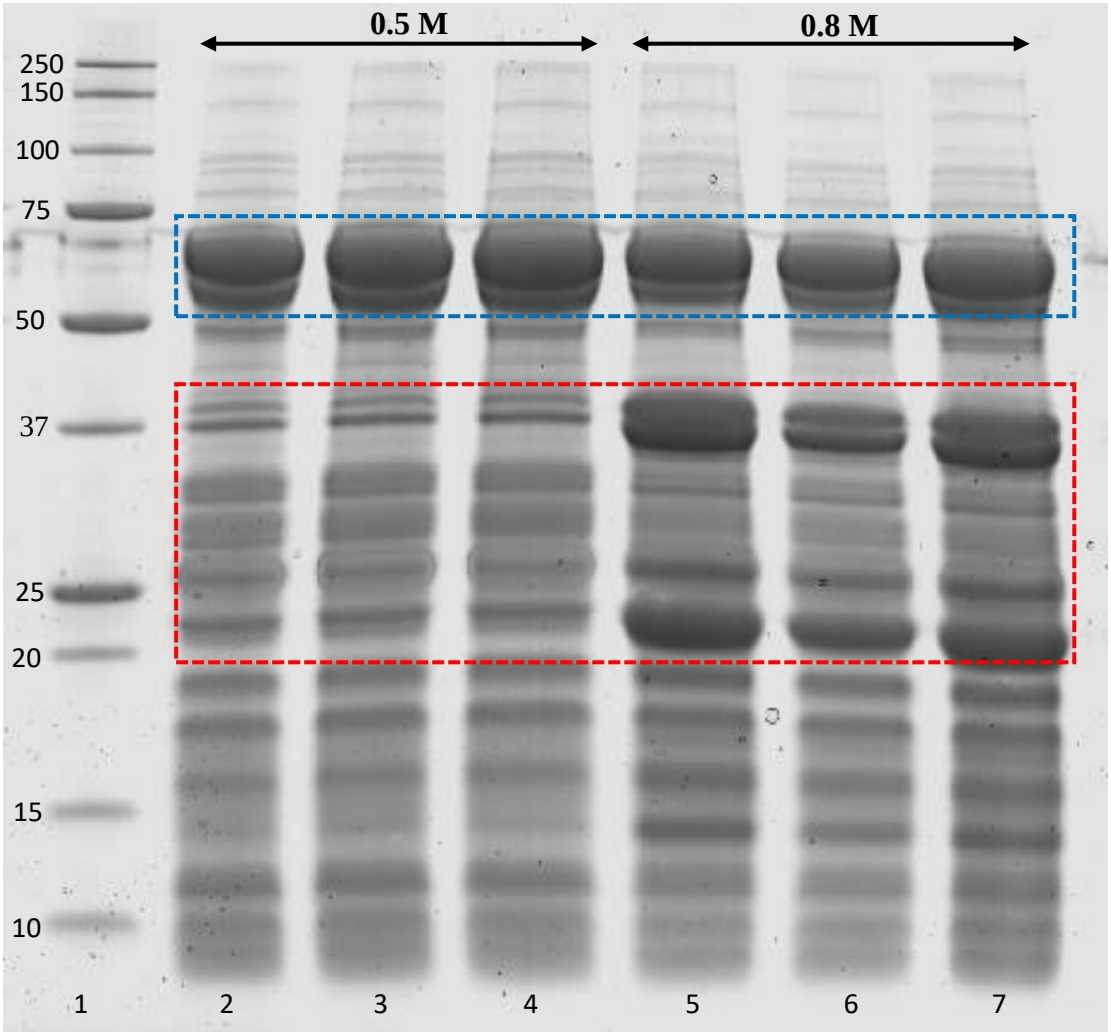


Figure V.1: SDS-PAGE patterns (in triplicate) of the proteins extracted at 0.5M (lanes 2-4) and 0.8M (lanes 5-7). Standard protein markers are in lane 1 (molecular weights are indicated on the left). Conarachins II subunits (~64 kDa) and arachins subunits (22-42 kDa) are surrounded.

V.1.3.2 Gelation and rheological properties

V.1.3.2.1 Evolution of the rheological properties during gelation

In this section, we discuss the rheological evolution of the sample during gelation, focusing only on the case in which the ionic strength (0.5 M or 0.8 M) imposed for protein extraction is also the one imposed during the gelation process. The latter consists in either (i) a thermal treatment at 95 °C for 40 min (TT process), or (ii) the same thermal treatment preceded by an enzymatic pretreatment with Transglutaminase at 40 °C for 3 h (eTT process).

All samples submitted to the TT process behave as usually observed for globular proteins (Spotti et al., 2017): in the initial suspension, the loss modulus G" is higher than the storage modulus G', then both moduli rapidly increase and reach a plateau with G'≈10G" (Figure V.2). When the temperature is decreased back to 25 °C, a further increase of the moduli occurs, with $G'_{25°C}$ / $G'_{95°C}$ ≈ 2-10, whatever the gelation process or the ionic strength. It is attributed to an entropic effect (Eleya and Turgeon, 2000) and a reinforcement of hydrogen bonding and intermolecular forces while decreasing the temperature (Chronakis and Kasapis, 1993).

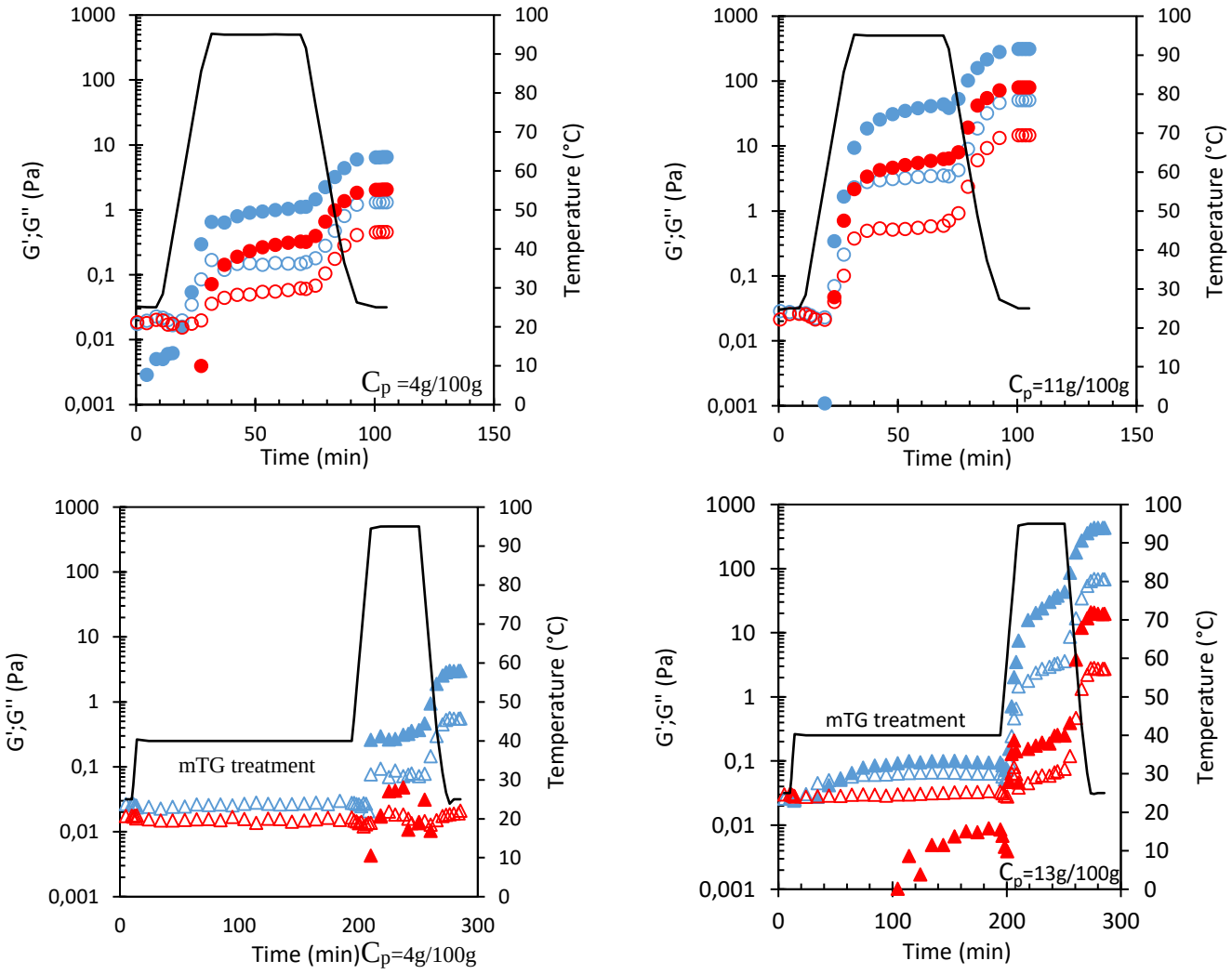


Figure V.2: Evolution of the storage (G', full symbols) and loss (G", empty symbols) moduli during gelation, for proteins extracted (and gelled) at ionic strength 0.5 M (blue) and 0.8 M (red). Top panels: thermal treatment alone (TT, circles). Low panels: enzymatic pre-treatment followed by the thermal treatment (eTT, triangles). Low concentration samples (Cp =4 g/100 g) are on the left and high concentration samples (Cp = 11 or 13 g/100 g) are on the right. Temperature profiles (continuous black lines) are plotted with an axis on the right hand side of the graph.

If the thermal treatment is preceded by an enzymatic pre-treatment (eTT process), the behavior is profoundly different and depends on both the ionic strength and the protein concentration.

At the lowest protein content (Cp ≈ 4 g/100 g), enzymatic pre-treatment itself is not associated with any rheological signature: both G' and G" remain constant, with the storage modulus that is almost negligible owing to the liquid-like behavior of the suspension. However, when submitted to the thermal treatment, the protein ability to form a gel is now limited: for the 0.8 M extract, gel formation is inhibited, while for the 0.5 M extract, gelation still occurred but gel strength (G'≈3 Pa) is lower than without pre-treatment (G'≈6 Pa).

At the highest protein content (Cp ≈ 11-13 g/100 g), both extracts form a gel. For the 0.5 M extract, gelation occurred during the enzymatic pre-treatment, giving rise to very weak gels (G'≈0.1 Pa). The following thermal treatment significantly strengthen the gel, and the final modulus is similar to the one obtained with thermal treatment only (G'≈300-450 Pa). By contrast, for the 0.8 M extract, gelation is not observed during enzymatic pre-treatment (but a slight increase in G' possibly suggests the formation of aggregates). Gelation occurred later on during the thermal treatment, but the final modulus remains below the one of samples only submitted to thermal treatment.

All gels showed finally a similar rheological signature, with G'/G"≈10 and a slight moduli dependence towards angular frequency ω: $G' \sim \omega^{a}$, with $0.08<a<0.2$ for $0.06\ rad.s^{-1}<\omega<10\ rad.s^{-1}$ (results not shown). Strain sweep confirmed that measurements conducted at γ=1% were well in the linear regime, however, we did not observe any evolution of the limit of linearity with the protein concentration, gelation process or ionic strength (results not shown).

These first results show that both ionic strength and gelation process play a key role. The 0.5 M extracts (conarachins-rich) exhibit a higher propensity to gel and result in firmer gels than the 0.8 M extracts (arachins-rich). The pre-treatment with transglutaminase results in gels with a lower strength, and inhibit gelation at low proteins concentration. In the next sections, we will investigate in details these effects.

V.1.3.2.2 Sol-gel transition

The sample gelation or sol-gel transition, determined as the cross-over between G‘ and G”, is now investigated.

For suspensions only submitted to thermal treatment, gelation occurred during the temperature ramp, 20 to 30 min after launching the experiments for temperatures ranging from 60 °C to 95 °C. For both ionic strengths, the gel point decreases with the protein concentration C_p (Figure V.3, top panels). The higher the C_p, the shorter the time required for the growing protein aggregates to span the entire volume, as observed for other globular proteins (Tobitani and Ross-Murphy, 1997).

For suspensions submitted to an enzymatic pre-treatment, the behavior depends on the ionic strength (Figure V.3, lower panels).

For the $E_{0.5}G_{0.5}$eTT samples (conarachins-rich), the gelation time depends on the protein concentration. At high concentrations (C_p > 6wt%), most of the samples gelled in the first three hours, during the enzymatic treatment. At low concentrations, (C_p < 6wt%), gelation only occurred later on, during the thermal treatment.

For the $E_{0.8}G_{0.8}$eTT samples (arachins-rich), the scenario is completely different. Although it is known that the transglutaminase activity increases with ionic strength (Kütemeyer et al., 2005), gelation always occurred during the thermal treatment (except for one single case). As arachins contain about 15 times less lysine (transglutaminase substrate) than conarachins (Brown, 1942; Wang, 2017), their reactivity under enzymatic treatment is much lower. During the thermal treatment, the gelation time decreases when the protein concentration increases, and the gelation temperature of the 0.8 M extract is higher, for a given concentration, than the one of the 0.5 M.

We also observe that the gelation time does not differ significantly whether gelation occurred at the ionic strength imposed for proteins extraction or at a different one under the experimental conditions investigated.

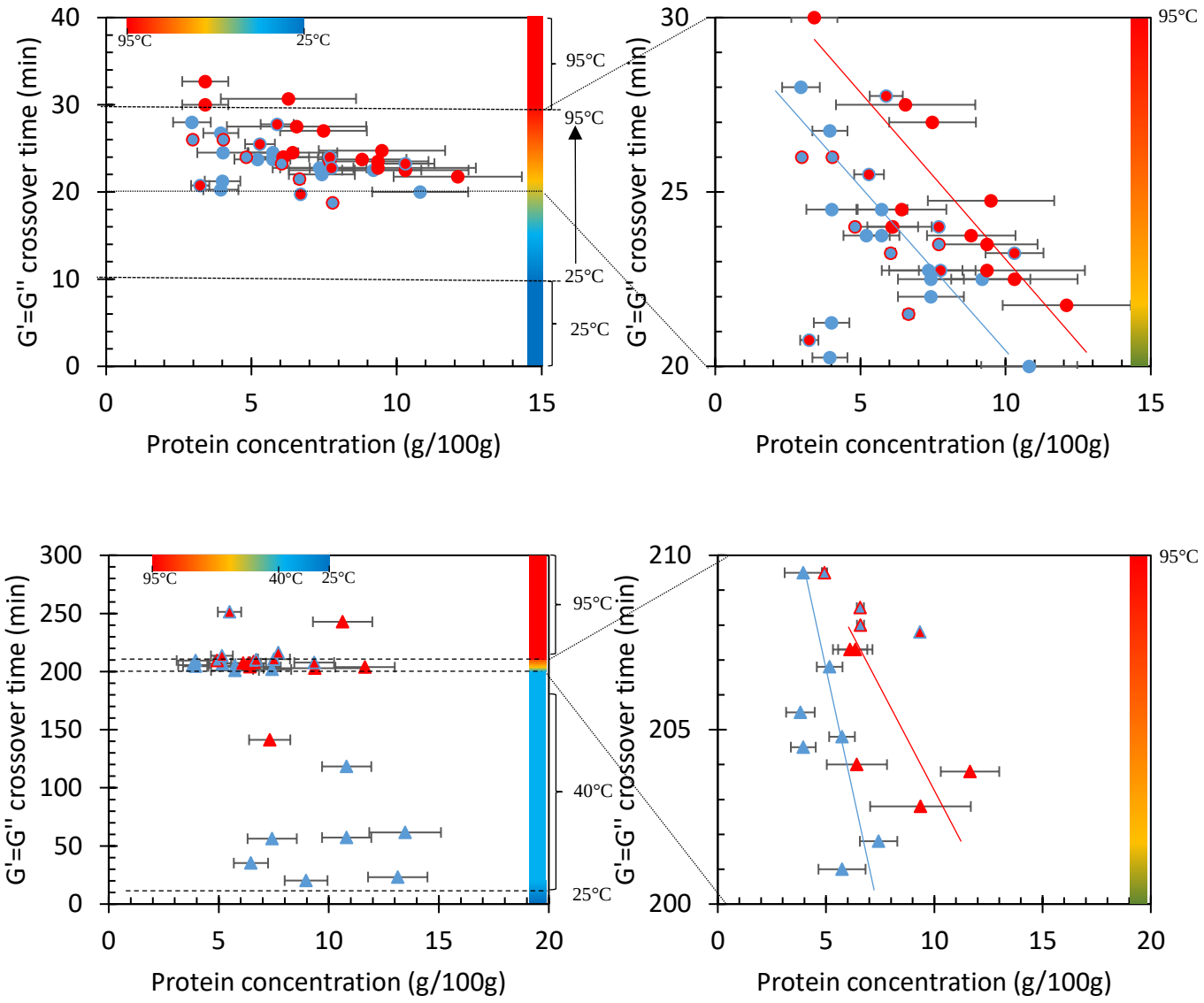


Figure V.3: Impact of protein concentration on the gelation time (cross-over between the storage G' and loss G'' moduli), for suspensions submitted to a thermal treatment only (top panel, circles) or to the same thermal treatment preceded by an enzymatic pretreatment (lower panels, triangles). Right panels zoom portions of the left panels during the temperature ramp. Color codes are: E0.5G0.5 (blue), E0.8G0.8 (red), E0.5G0.8 (blue circled with red), E0.8G0.5 (red circled with blue). Color lines are guides to the eye.

V.1.3.2.3 Fractal-like scaling of the storage modulus

One common pathway for proteins and colloids gelation consists in the fractal aggregation of individual elementary objects eventually forming a three-dimensional network (Ikeda et al., 1999; Wu and Morbidelli, 2001). A rheological signature is the power-law scaling of the plateau storage modulus of the gel with the protein concentration or volume fraction. This has been observed for peanut-protein gels formed by acidification (Bi et al., 2019), but, as far as we know, never evidenced

on heat-set gels of these proteins. Fractal dimensions can be estimated from the power-law exponent, with the following equation (Shih et al., 1990):

$$G' \propto \varphi^{(3+d)/(3-Df)}$$

With G' the storage modulus of the gel (in Pa), ϕ the volume fraction of the proteins, d the fractal dimension of the backbone (between 1.1 and 1.3), and D_f the fractal dimension of the gel.

For samples submitted to a thermal treatment only, the storage modulus indeed follows $G' \sim C_p{}^x$, with x=3.4 (Figure V.4). Applying the equation given above, we obtain a fractal dimension $1.74<D_f<1.82$, suggesting a diffusion-limited cluster aggregation regime (Lin et al., 1989). The fractal-like scaling is similar for both extracts, however, for a given protein concentration, conarachins-rich samples (0.5 M extracts) exhibit a higher storage modulus than arachins-rich samples (0.8 M extracts). This is attributed to the higher sulfur content of conarachins, resulting in a higher propensity to form disulfide bonds during thermal treatment.

For samples submitted to an enzymatic pre-treatment before the thermal treatment, the power-law scaling of the storage modulus is also found.

For the $E_{0.5}G_{0.5}$eTT samples, the exponent is x = 4.6, which corresponds to a fractal dimension $2.07<D_f<2.13$, characteristic of a reaction limited cluster aggregation regime, during which dense clusters are formed (Lin et al., 1989). Beside low concentration samples gelled during the thermal treatment, and high concentration samples gelled during the enzymatic pre-treatment, this does not apparently affect the final modulus, suggesting that the characteristic scale probed during oscillatory shear has the same fractal dimension, resulting from the initial enzymatic cross-linking.

For the $E_{0.8}G_{0.8}$eTT samples, the range of concentration for which samples gelled is much limited: all samples with C_p>7wt% gelled, but none of the samples for C_p<6.1wt%. For 6.1wt%<C_p<7wt%, half of the 6 samples investigated gelled, and the other half did not, suggesting a minimum concentration for gelation C_g≈6.5wt%. As the concentration range in which gel are obtained is reduced, the determination of the fractal exponent is difficult. Still, the data are compatible with a value of 4.6, as for the $E_{0.5}G_{0.5}$eTT samples. The absence of gelation below C_g≈6.5wt%, contrarily to the $E_{0.5}G_{0.5}$eTT samples, could result from (i) their lower content in conarachins (rich in sulfur and lysine, both involved in enzymatic and thermal gelation), and (ii) the higher density of the aggregates formed during enzymatic pretreatment (higher fractal dimension), which occupy less volume but rapidly include most, if not all, of the little amount of conarachins solubilized in these extracts.

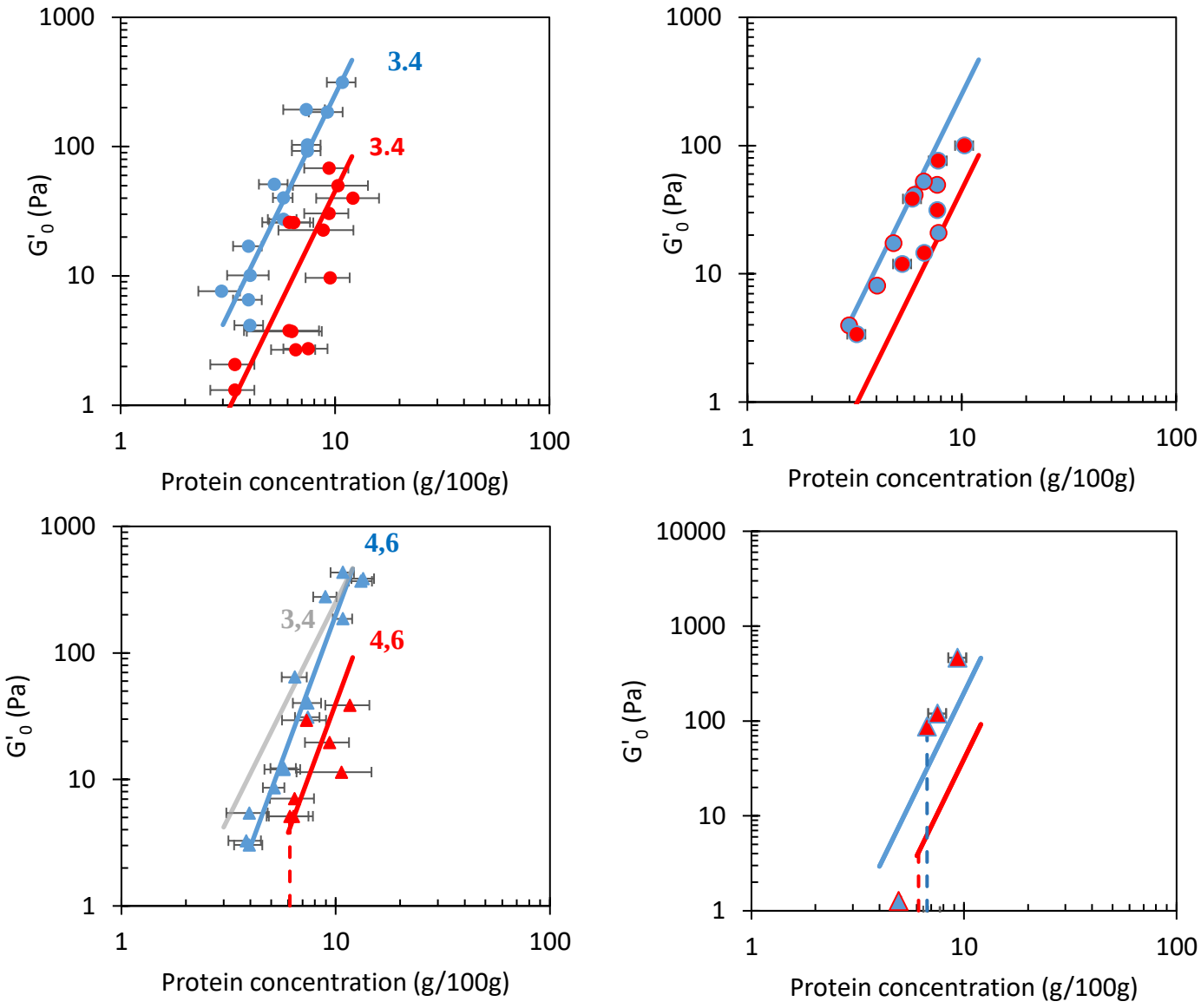


Figure V.4: Storage modulus G' (Pa) as a function of the protein concentration Cp (g/100g) for gels obtained by thermal treatment (top panels, circles) and by the same thermal-treatment preceded by an enzymatic pretreatment (lower panels). Color code are the following: blue: E0.5G0.5, red: E0.8G0.8, blue circled with red: E0.5G0.8, red circled with blue: $E_{0.8}G_{0.5}$. Continuous lines (left panels) represent power-law fits of the data for samples extracted and gel at the same ionic strength, they are reproduced on the right panels to help the reader (the power-law fit obtained on $E_{0.5}G_{0.5}$TT is reproduced in grey in the lower panel). Gelation does not occur at protein concentrations below the vertical dotted lines (in red and blue).

It is worth noticing the different behaviors of proteins that were extracted at a certain ionic strength and then gelled at a different ionic strength. $E_{0.5}G_{0.8}$TT and $E_{0.8}G_{0.5}$TT samples exhibit a modulus which value lays between the one of their counterpart extracted and gelled at the same ionic strength, e.i. samples $E_{0.5}G_{0.5}$TT and $E_{0.8}G_{0.8}$TT, respectively. However, if submitted to an enzymatic pre-treatment, the sample gelation is strongly limited. For $E_{0.5}G_{0.8}$eTT samples, out of 5 samples for which

3.1wt%≤C_p≤7.7wt%, only one gelled (for C_p≈5wt%), but exhibited a very weak modulus (G'≈1 Pa). The change in ionic strength, from 0.5 M during extraction to 0.8 M for gelation, may have resulted in the partial insolubilization of the conarachins extracted at 0.5 M, thus reducing the suspension propensity to gel. For $E_{0.8}G_{0.5}$eTT samples, three samples were prepared with 3.1wt%≤C_p≤7.7wt%, and none of them gelled. For C_p>7.7wt%, gel moduli are slightly higher to the ones observed for the $E_{0.5}G_{0.5}$eTT samples. This might result from the partial solubilization of a small fraction of conarachins, initially present in the suspension as insoluble aggregates, thereby reinforcing the gel.

V.1.3.3 Gels microstructure

Confocal images of peanut protein gels structure acquired on the samples produced at high protein concentration are presented in Figure V.5 (samples prepared at low protein concentration are so weak that they broke in pieces during manipulation). While it is not possible to distinguish between the two extracts at 0.5 M and 0.8 M, it can be observed that applying an enzymatic pretreatment gives a much thinner and denser structure, which is coherent with the fractal dimensions previously determined.

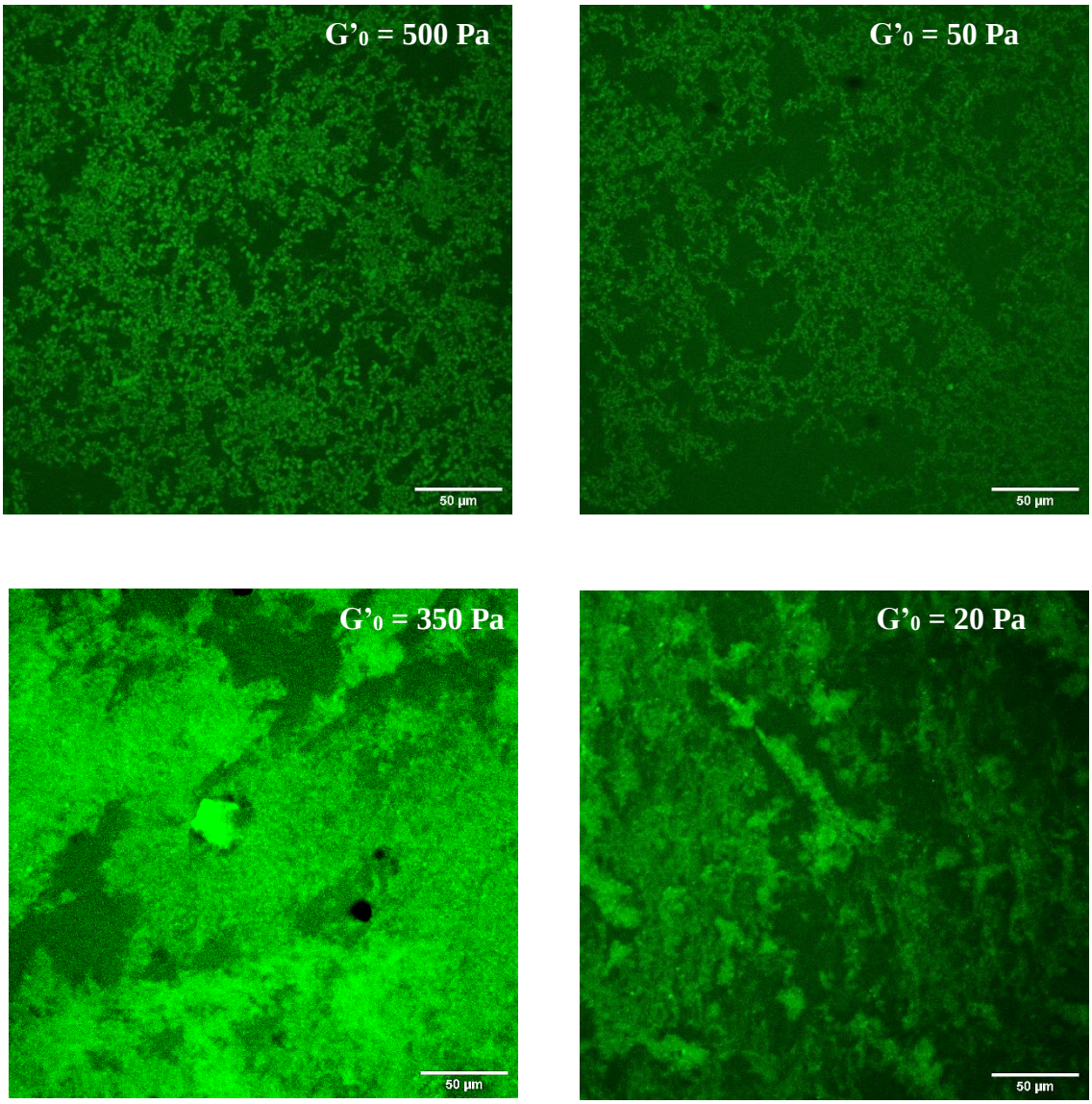


Figure V.5: Images of peanut protein gels (Cp = 12g/100g) obtained by CSLM (magnification x40). Proteins are stained in green. Gelation was obtained by Thermal Treatment (TT, top), or by an enzymatic pre-treatment before the thermal treatment (eTT, bottom). Proteins were extracted and gelled at 0.5M (left) or 0.8M (right). Scale bar are 50 µm.

V.1.4. Conclusion

Peanut proteins extracted at different ionic strength, 0.5 M or 0.8 M, strongly differ in their conarachins/arachins relative contents. We showed that conarachins, extracted in larger quantities at 0.5 M, strongly contribute to gel formation and gel elasticity. When submitted to a thermal treatment, conarachins-rich samples gelled at a lower temperature and if the thermal treatment is preceded by an enzymatic pre-treatment, their gelation is observed already during the pretreatment (for high enough protein concentration), which is not the case of the arachin-rich samples. For a given gelation process, conarachins-rich samples also give stronger gels. This is attributed to their higher cysteine and lysine contents, two amino-acids involved in protein cross-linking during thermal or enzymatic treatment. Observations in confocal microscopy showed that the enzymatic pre-treatment gives much denser and thinner structures. Indeed, while the fractal dimension of thermally treated samples, estimated from rheological measurement, is about 1.7, it increases to about 2.1 for enzymatically pre-treated samples. These values are characteristic of gels formed in the diffusion-limited and reaction-à des cluster aggregation regimes, respectively. The ionic strength imposed during gelation (in the investigated range) does not strongly modify the gels properties, except if an enzymatic-pre-treatment is applied. In that case, gelation is inhibited if an ionic strength different from the extraction one is imposed, suggesting solubility loss. Ionic strength and transglutaminase pre-treatment therefore constitute two parameters that can be tuned during food processing to generate protein gels with different properties.

V.2 Résultats complémentaires

V.2.1 Etude de l'impact de la lyophilisation sur les propriétés physico-chimiques et rhéologiques de la fraction intermédiaire

Les résultats présentés dans l'article ont été obtenus à partir de fractions intermédiaires lyophilisées, resuspendues de façon à obtenir différentes concentrations en protéines et enfin dialysées à différentes forces ioniques. Afin de vérifier que ces suspensions reconstituées étaient représentatives de la fraction intermédiaire constitutive du mix d'arachide, des mesures physico-chimiques et rhéologiques ont été réalisées.

Dans un premier temps, le pH et la conductivité de la phase intermédiaire et des solutions reconstituées ont été comparés. Un très faible écart de pH (<0,2) a été mesuré entre la fraction intermédiaire et la solution reconstituée, à même concentration en protéines (figure V.6 B). Cet écart pourrait être dû à la perte de petites molécules possédant un pouvoir tampon, lors de la dialyse. La conductivité de l'échantillon lyophilisé, resuspendu dans l'eau distillée puis dialysé est, pour une même concentration en protéines, plus importante que celle de la fraction intermédiaire. Cela pourrait aussi s'expliquer par la présence de glucides simples, solubles dans la fraction intermédiaire et de poids moléculaires < 3 kDa (comme le saccharose, sucre majeur de la graine d'arachide (Liu et al., 2016)), qui pourraient être libérés dans le bain de dialyse au cours des 48 heures (Niemczycki and Galecki, 1938). Cette hypothèse est cohérente avec le fait que la conductivité électrique du mix qui contient de nombreux composants insolubles (imposant un pouvoir tampon) est plus faible que celle de la fraction intermédiaire pour une même force ionique (24,7 mS/cm et 36,6 mS/cm respectivement, à 0,5 et 0,8 mol/L).

De façon générale, et comme attendu, la conductivité est plus élevée à 0,8 mol/L qu'à 0,5 mol/L (rapport de 1,4), indépendamment de la concentration en protéines.

On observe également une diminution significative de la conductivité avec l'augmentation de la concentration en protéines, de même amplitude aux deux force ioniques étudiées. Cette évolution est attendue : les ions apportés avec les protéines conduisent à une faible augmentation de la conductivité d'une solution saline, et l'ajout de plus fortes concentrations en protéines entraîne une diminution de cette conductivité (Nichols and Atchley, 1925). La concentration en protéines n'influe en revanche

pas sur le pH qui varie très peu d'un échantillon à l'autre à 0,5 mol/L (pH=6,5±0,1) et pas du tout à 0,8 mol/L (pH=6,3±0,0) (voir figure V.6 B).

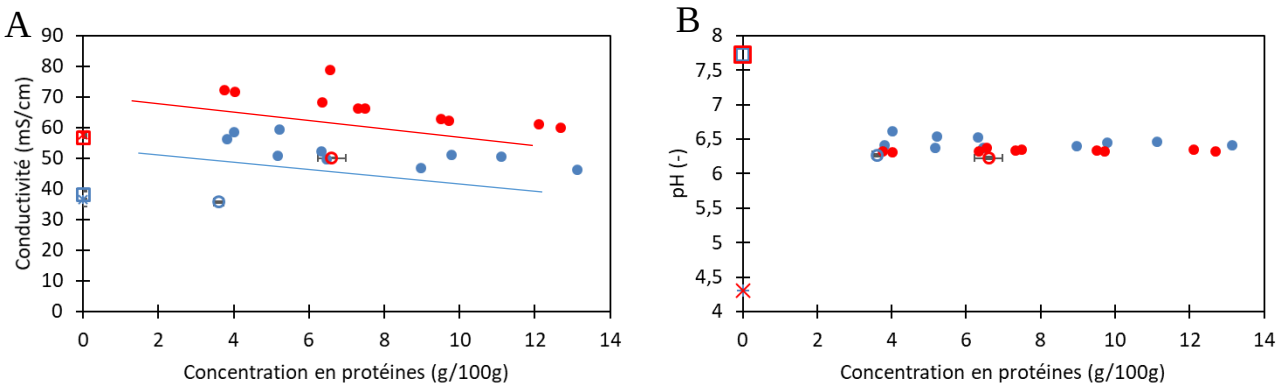


Figure V.6 : Effet de la concentration en protéines sur la conductivité électrique de différents échantillons. Ronds pleins : lyophilisat resuspendu et dialysé, Ronds creux : fraction intermédiaire, Carrés : Eau courante (utilisée pour la fraction intermédiaire), Etoile : Eau distillée (utilisée pour la remise en suspension du lyophilisat). En bleu : 0,5 mol/L ; en rouge : 0,8 mol/L

La conductivité est donc dépendante de plusieurs paramètres autres que la concentration en sel : concentration en protéines, présence de glucides. Notre protocole de dialyse, s'il permet de maintenir le pH et la force ionique, permet donc également d'éliminer les sucres solubles présents dans la fraction intermédiaire.

Afin de s'assurer que les propriétés rhéologiques observées sur les solutions reconstituées étaient bien représentatives des propriétés de la fraction intermédiaire, cette dernière a été extraite dans les deux conditions de force ionique puis gélifiée en triplicat, en appliquant le même traitement thermique, précédé ou non d'un prétraitement enzymatique. Avec prétraitement enzymatique, il n'a pas été possible de produire un gel de façon répétable. En effet, les concentrations en protéines de la fraction intermédiaire étant respectivement de 3,6±0,1 et 6,6±0,4 g pour 100 g de solution à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L, nous sommes proches des concentrations minimales gélifiantes à 0,5 et 0,8 mol/L, estimées autour de 4 g/100 g à 0,5 mol/L et de 6 g/100 g à 0,8 mol/L (figure V.4). En revanche, la phase intermédiaire gélifie lors d'un traitement thermique seul (sans prétraitement enzymatique). Les valeurs de G' obtenues sont reportées sur la figure V.7, où elles sont comparées aux valeurs obtenues sur les solutions reconstituées (présentées précédemment en figure V.4, sur l'illustration située en haut à gauche). Les mesures de module ont été répétées trois fois sur les phases intermédiaires, ce qui permet de déterminer une valeur moyenne et un écart-type, représentés sur le graphique par des barres d'erreur verticales. Les mesures ont été réalisées à une seule concentration en protéine : la concentration de cette phase intermédiaire. A l'inverse, pour les solutions reconstituées, la dilution

partielle des solutions au cours de la dialyse génère une incertitude sur la concentration, représentée par des barres d'erreur horizontales. Nous n'observons pas de différence significative entre les modules des phases intermédiaires et ceux des solutions reconstituées, à même concentration en protéines. Cela implique que les sucres solubles présents dans la fraction intermédiaire et absents des échantillons dialysés n'influe pas les propriétés rhéologiques de gels de protéines d'arachide. L'évolution de la force du gel en fonction de la concentration en protéines a également pu être confirmé par mesure de texture (annexe IV).

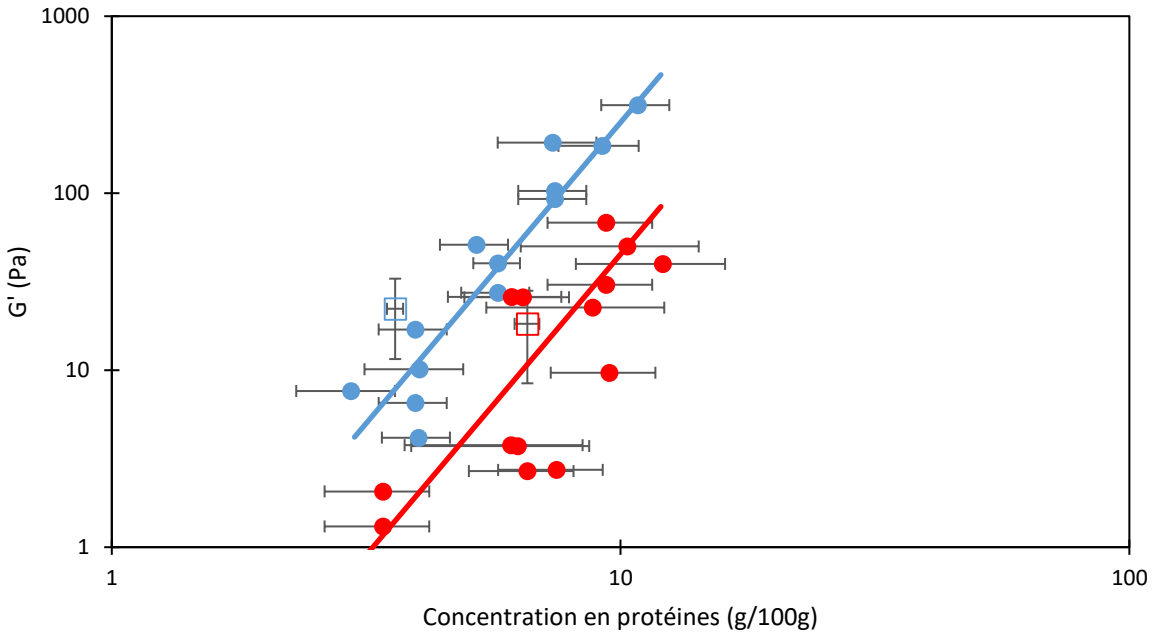


Figure V.7: Comparaison des gels thermiques formés à partir de la fraction intermédiaire et des gels formés à partir de protéines lyophilisées et resuspendues. Carrés : fraction intermédiaire ; ronds : lyophilisats. En bleu : échantillon à 0,5 mol/L ; en rouge : échantillon à 0,8 mol/L de NaCl.

Ainsi, nous avons démontré que les suspensions reconstituées à partir de lyophilisat puis dialysées différaient légèrement de la fraction intermédiaire initiale, notamment en terme de conductivité. Cela nous a permis d'identifier la perte de petites molécules, probablement de glucides simples, lors de la dialyse. Malgré l'absence de ces molécules, le pH et les propriétés rhéologiques de ces solutions sont très proches de la fraction intermédiaire, ce qui suggère qu'elles constituent de bons modèles, aux propriétés représentatives de la fraction intermédiaire.

V.2.2 Etude de l'impact du traitement enzymatique sur l'agrégation des protéines d'arachide

Les différences de propriétés rhéologiques observées entre des échantillons ayant subi ou non un pré-traitement enzymatique par la transglutaminase sont dues à la différence de structure des échantillons avant de les soumettre à un traitement thermique. Pour caractériser cet effet de structuration, la taille des structures présentes en solution et leur évolution au cours d'un traitement enzymatique ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière. Pour cela, des échantillons de fractions intermédiaires extraites à 0,5 mol/L et 0,8 mol/L ont été dilués cent fois et filtrés à travers un filtre 0,2 µm afin d'obtenir une solution translucide. Deux populations sont observées dans les fractions intermédiaires avant action enzymatique : la population majoritaire (>90 % en masse) est constituée d'objets de diamètre 20 nm et la population minoritaire (<10 % en masse) d'objets de plus grands diamètres, de l'ordre de 100-120 nm. L'arachine et la conarachine sont toutes deux de diamètre compris entre 14 et 16 nm (Cabanos et al., 2011; Jin et al., 2009). Le premier groupe pourrait donc correspondre à ces protéines ou à de petits agrégats dispersés, tandis que le second correspondrait à des agrégats protéiques de diamètre plus important.

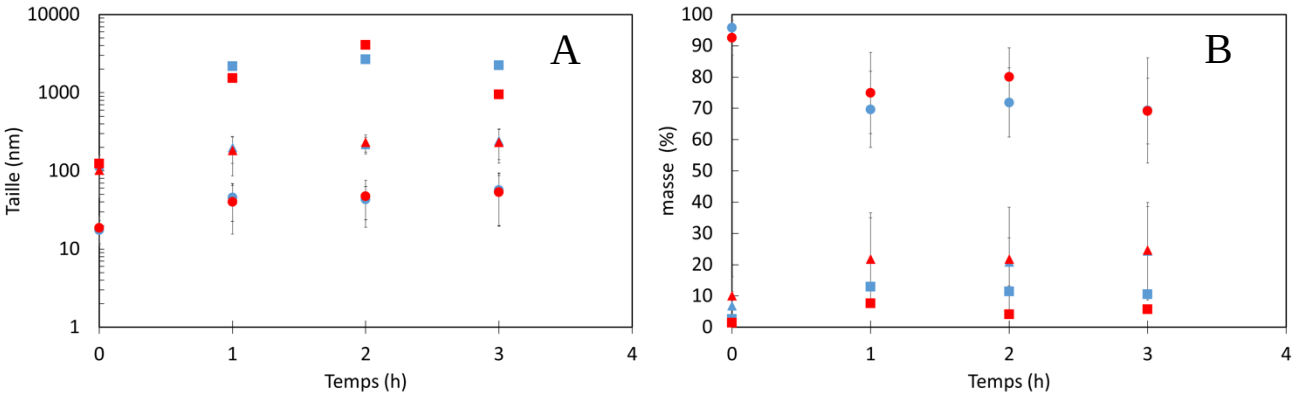


Figure V.9: Evolution de la taille (A) et de la fraction massique (B) des objets présents dans la fraction intermédiaire extraite à 0,5 mol/L (en bleu) et à 0,8 mol/L (en rouge) de force ionique au cours du traitement enzymatique. Les différentes populations sont distinguées par des ronds, des triangles et des carrés

Après une heure de traitement enzymatique, on observe une augmentation de la taille et une diminution de la quantité de la population des éléments initialement observés à 20 nm, qui atteignent 50±10 nm et représentent alors 70±10 % de la masse de l'échantillon, contre plus de 90 % avant traitement. On observe également une augmentation de la taille et de la quantité des agrégats de 100-120 nm, qui atteignent une taille moyenne de 200 nm et représentent alors environ 20 à 30 % de la

masse de l'échantillon. Enfin, on observe, après une heure de traitement, l'apparition d'une troisième population de diamètre >1 µm, qui représente près de 10 % de la masse de l'échantillon. Au-delà d'une heure de traitement, on n'observe plus d'évolution significative de la taille des agrégats. Considérant la faible concentration en protéines dans les solutions étudiées (0,04 g et 0,07 g/100 g à 0,5 et 0,8 mol/L, respectivement), il est cependant possible que les cinétiques d'agrégation enzymatique soient ralenties par rapport aux conditions de gélification des solutions protéiques, du fait de la distance plus grande entre agrégats et enzymes.

Conclusions du chapitre

La **lyophilisation des protéines** de la fraction intermédiaire puis leur re-suspension et dialyse nous ont permis d'obtenir des **solutions de concentration en protéines et force ionique contrôlées**. Ce procédé induit la **perte de molécules solubles** présentes dans la fraction intermédiaire, probablement des **glucides** de taille inférieure au seuil de coupure de la membrane de dialyse utilisée.

Néanmoins, le **pH** et les **propriétés rhéologiques** de la **fraction intermédiaire** sont bien **retrouvés dans** les suspensions obtenues à partir de protéines lyophilisées.

A partir des propriétés rhéologiques, nous avons estimé les **dimensions fractales** des gels (1,7 pour les gels formés par traitement thermique seul (TT) et 2,1 pour les gels formés par prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique (eTT). Ces résultats démontrent des **comportements différents lors de la gélification**, résultants en des **structures de réseaux protéiques différentes**.

La dimension fractale plus élevée à l'issue d'un traitement enzymatique peut s'expliquer par un **réseau plus dense et plus hétérogène** que lors d'un traitement thermique seul. Cela a pu être confirmé par **microscopie confocale**.

La **force ionique** permet de **piloter le ratio conarachine/arachine**, avec un ratio ~5 à 8 fois plus important à 0,5 mol/L qu'à 0,8 mol/L de force ionique. Nous avons démontré que ce ratio avait un **effet important sur les modules de conservation** des gels. En effet, le module élastique des gels est plus élevé lorsque le **ratio conarachine/arachine** est **plus important**.

Chapitre VI : Rôle des fractions dispersées dans les processus de gélification

Une suspension aqueuse de graines d'arachide broyées est constituée d'une phase aqueuse contenant des protéines solubilisées dans laquelle sont dispersés des gouttelettes lipidiques (ou sphérosomes), ainsi que de particules insolubles telles que des grains d'amidons. Nous avons précédemment étudié la gélification de la phase aqueuse continue, or, de nombreux travaux suggèrent que la présence d'une phase dispersée dans une solution de protéines affecte, positivement ou négativement, les propriétés rhéologiques (module élastique, propriétés à la rupture) du gel formé par la phase continue seule (Dickinson, 2003, 1997; Genccelep et al., 2015; Sala et al., 2007; van der Poel, 1958; van Vliet, 1988; Yang et al., 2013). Dans ce chapitre, nous allons dans une première partie étudier l'impact de la fraction volumique de sphérosomes (corps lipidiques) sur les propriétés rhéologiques d'un gel de protéines d'arachide. Dans une deuxième partie nous étudierons le rôle de la partie insoluble du mix, obtenue par centrifugation, sur la structuration du système. Dans les deux études, les traitements utilisés sont ceux mis en œuvre précédemment pour la gélification des mix et des solutions de protéines d'arachide.

VI.1 Effets de l'incorporation de corps lipidiques sur les propriétés des gels de protéines

Les sphérosomes de l'arachide sont stabilisés par une membrane constituée de phospholipides et de protéines, on fait donc ici l'hypothèse qu'ils sont moins déformables et plus rigides que la phase continue dans laquelle ils sont dispersées (le gel protéique) afin d'analyser nos résultats. Comme démontré par Van der Poel, on peut mesurer l'effet de l'ajout de particules sphériques non déformables à différentes fractions volumiques en étudiant le quotient du module élastique de la dispersion gélifiée sur le module élastique de la phase continue gélifiée en l'absence d'éléments dispersés. Les pourcentages volumiques de lipides choisis représentent d'une part celui obtenu dans le mix global (~25 % v/v de phase continue, hors fraction insoluble (culot)), et d'autre part deux autres pourcentages encadrant le premier. Les échantillons ont été préparés par fractionnement et reconstruction de mélanges selon le protocole décrit en matériel et méthodes (figure III.2.). La fraction intermédiaire récupérée après centrifugation à 250 g pendant 2 h constitue un échantillon contenant une faible concentration en lipides (~7 % v/v). Le surnageant re-mélangé avec la fraction intermédiaire récupérée en constitue un second, représentatif de la quantité de protéines solubles et de lipides dans le mix (~25 %). Enfin, le surnageant récupéré et mélangé dans un faible volume de fraction intermédiaire (centrifugée à nouveau à 250 g pendant 2 h) constitue un troisième échantillon

plus concentré en lipides (~40 % v/v). La phase intermédiaire récupérée après une centrifugation à 10 000 g pendant 2 h (0 % v/v) sera utilisée comme témoin. Ainsi, 4 niveaux de fraction volumique de lipides sont comparés : 0 %, 7 %, 25 % et 40 %.

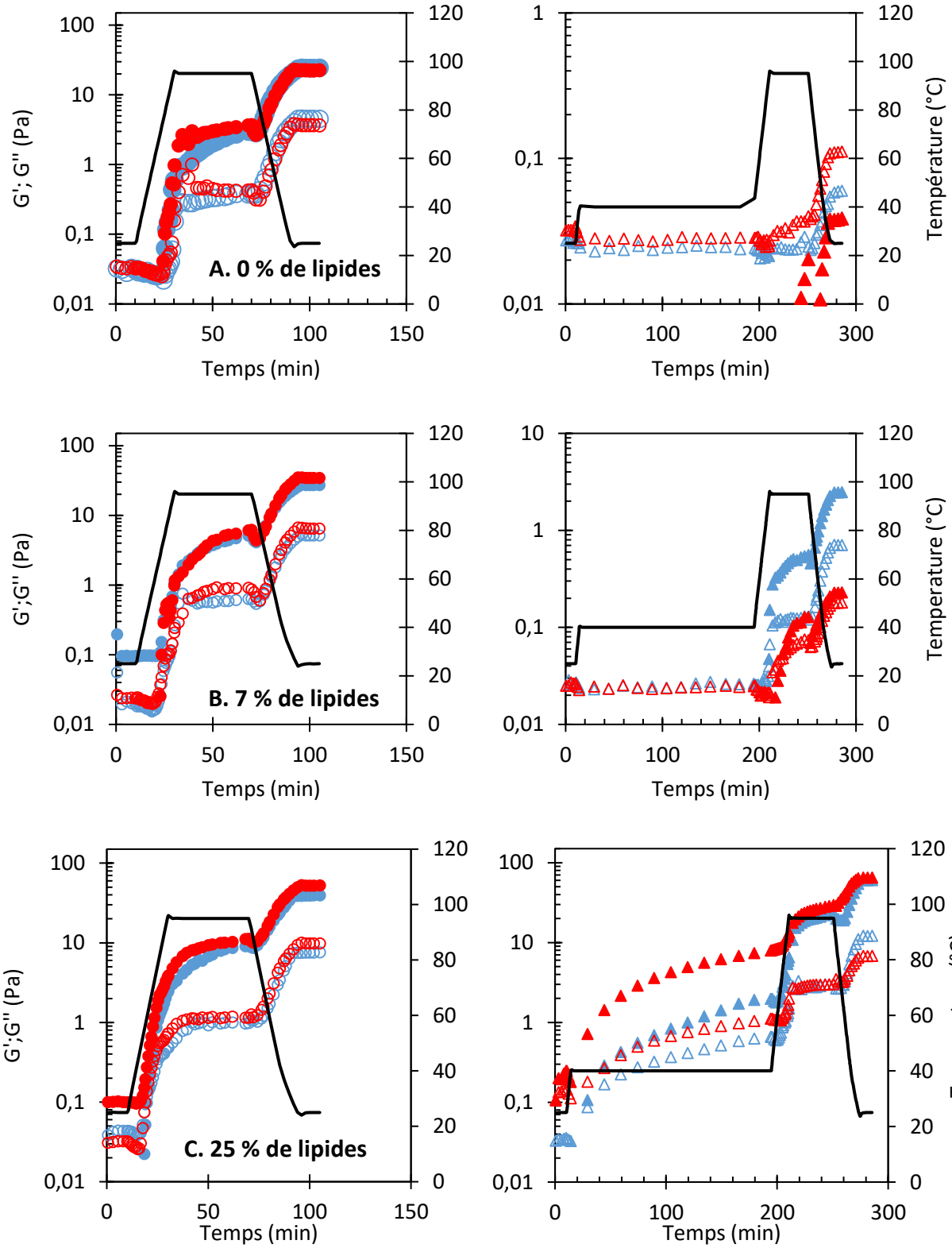
Les concentrations en protéine dans la phase aqueuse du mix sont de 3,6 g/100 g à 0,5 mol/L de NaCl et de 6,6 g/100 g à 0,8 mol/L de NaCl. Ces deux phases sont respectivement riches en conarachines et en arachines. A ces concentrations en protéines, il est possible d'obtenir un gel de protéines d'arachide via une gélification thermique à 95°C pendant 40 min, mais aucun gel ne se forme lorsqu'un prétraitement enzymatique est appliqué avant le traitement thermique. Dans ce dernier cas, la concentration en protéine est proche de la concentration limite de gélification définie dans le chapitre précédent (estimée aux alentours de 3,8 et 6,5 g/100 g à 0,5 et 0,8 mol/L).

VI.1.1 Evolution des cinétiques de gélification en fonction de la fraction volumique en lipides

La gélification des différents échantillons est suivie in situ dans un rhéomètre et les modules de cisaillement sont suivis en fonction du temps. Une courbe représentative de chaque condition est représentée en figure VI.1.

Indépendamment de la force ionique et de la fraction volumique en lipides, les gels thermiques présentent un profil de gélification similaire avec un premier plateau atteint pendant l'étape de chauffage et un second plateau avec des valeurs de modules plus élevées au refroidissement. Les modules augmentent avec la concentration en lipides ajoutés.

Dans le cas d'un prétraitement enzymatique, alors que le témoin sans lipide ne forme pas de gels à aucune des forces ioniques, le système contenant 7 % de lipides (v/v) forme un gel faible lors du traitement thermique final. En revanche, à partir de 25 % et à 40 % de lipides, une gélification est obtenue dès le prétraitement enzymatique.


A. 0 % de lipides
B. 7 % de lipides
C. 25 % de lipides
G';G'' (Pa)
Température (°C)
Temperature (°C)
Temps (min)

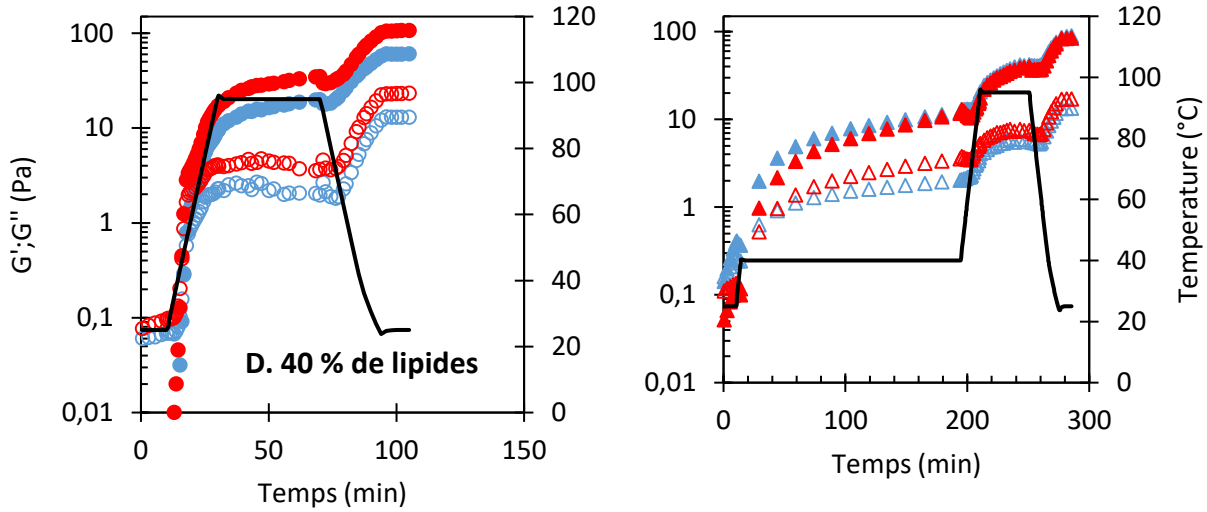


Figure VI.1 : Evolution du module G' (symboles pleins) et G''(symboles vides) au cours de la gélification de la fraction intermédiaire A) délipidée, ou contenant B) 7 % (v/v), C) 25 % (v/v) et D) 40 % (v/v) de lipides. Les fractions intermédiaires ont été extraites et préparées à 0,5 mol/L (bleu) et 0,8 mol/L (rouge). A gauche: traitement thermique seul. A droite: Prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique. Les profils de températures sont représentés par une ligne noire continue (axe de droite).

Comme dans le cas des suspensions de type mix, on peut observer des modules G' supérieurs aux modules G'' avant tout traitement, ne permettant pas d'utiliser le point de croisement G'=G'' comme indicateur pour caractériser la gélification. On se propose donc de caractériser les cinétiques de structuration par la vitesse maximale d'augmentation du module ou vitesse maximale de structuration, et le temps auquel cette vitesse est atteinte, comme dans le chapitre IV (résultats présentés dans le tableau VI.1).

Dans le cas de traitement thermique, la valeur de la vitesse maximale de structuration semble indépendante de la fraction volumique en sphérosome. Elle intervient cependant plus tôt à plus forte fraction volumique, ce qui est cohérent avec l'observation des courbes (figures VI.1) qui supposait que le gel se forme plus rapidement à plus forte fraction volumique en sphérosomes. Ainsi, à 40 % de lipides, cette structuration est atteinte 12 ou 15°C en dessous des 95°C nécessaires pour les gels de protéines seules. Il ne semble pas y avoir de différences entre les gels formés à 0,5 et à 0,8 mol/L

Dans le cas d'un prétraitement enzymatique, pour des fractions volumiques supérieures ou égales à 25 % de lipides, il est possible de définir deux vitesses maximales, l'une correspondante à la structuration du système pendant le traitement enzymatique et la seconde à la structuration supplémentaire par le traitement thermique (tableau VI.1). Les valeurs des vitesses de structuration pendant le traitement thermique ne changent pas de manière significative ($p>0,05$) entre les échantillons à 25 % et ceux à 40 % (v/v) de lipides ni en fonction de la force ionique. La vitesse

maximale est en revanche atteinte plus rapidement pour un système à 40 % v/v de lipides et 0,5 mol/L de NaCl. Les protéines seules ne permettant pas la gélification du système, il peut être avancé comme hypothèse que les corps lipidiques participent à la structuration du gel lors d'un traitement enzymatique, pour une fraction volumique minimum comprise entre 7 % et 25 % (aux concentrations en protéines étudiées). Des interactions entre les protéines de surface des sphérosomes, riche en lysine et glutamine, et les protéines en solution peuvent être à l'origine de cet effet. La plus forte concentration en protéines solubles à 0,8 mol/L ne permet pas de favoriser ces interactions. Il est à noter que la nature des protéines est également différente. Le ratio conarachine/arachine plus important à 0,5 mol/L suggère que les conarachines interagissent plus que les arachines. Il peut être envisagé également qu'à forte fraction volumique des interactions puissent s'établir entre les sphérosomes eux-mêmes *via* les protéines présentes à l'interface. Ces protéines sont effectivement riches en glutamine et lysine également, ce qui en fait de bons substrats pour un procédé de gélification par traitement enzymatique par la transglutaminase (Zaaboul et al., 2018).

Tableau VI.1: Valeur, température et temps d'apparition de la vitesse maximale de structuration des gels formés à différentes fractions volumiques en lipides, par un traitement thermique seul et par un prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique, à 0,5 mol/L et 0,8 mol/L.

Fraction volumique en lipides	Vitesse maximale de structuration	Traitement thermique		Prétraitement enzymatique + traitement thermique			
				0,5 mol/L		0,8 mol/L	
		0,5 mol/L	0,8 mol/L	Prétraitement enzymatique	Traitement thermique	Prétraitement enzymatique	Traitement thermique
0 %	dG'/dt (Pa/min)	0,27±0,2	0,46±0,3				
	Température (°C)	93,9±1,8	95±0,8				
	Temps (min)	31,1±2	30,4±0,8				
7 %	dG'/dt (Pa/min)	0,52±0,19	1,22±1,83		0,06±0,08		6,9±10,5
	Température (°C)	93,9±0,5	90,1±9,5		95±0		89,2±5,2
	Temps (min)	29,6±0,1	30,4±0,8		221,7±9,9		221,1±21,8
25 %	dG'/dt (Pa/min)	0,46±0,07	0,57±0,11	0,1±0,1	0,8±0,9	0,05±0	0,73±0,9
	Température (°C)	93,3±1,6	92,5±1,8	40±0	94,7±0,7	40±0	94,8±0,5
	Temps (min)	29,8±0,8	31,4±4,9	30,9±5,7	219,3±9	36,7±3,5	220,8±10,3
40 %	dG'/dt (Pa/min)	5,5±7,3	1,7±0,5	0,1±0	2,5±0,7	0,5±0,6	2,0±0,3
	Température (°C)	77,7±0,9	83,1±8,3	40±0	93,9±0,5	40±0	94,7±0,6
	Temps (min)	25±0,3	26,5±2,4	19,9±3,2	210,5±0,3	33,3±2,6	210,9±0,5

VI.1.2 Effet de la fraction volumique en lipide sur les propriétés rhéologiques finales des gels

Lorsqu'on étudie les propriétés rhéologiques des gels obtenus, on constate que la présence de différentes fractions volumiques de lipides modifie plusieurs des propriétés rhéologiques du gel, telles que le module élastique, la limite de linéarité viscoélastique et le seuil d'écoulement à la déformation, et ce avec ou sans l'application d'un prétraitement enzymatique (tableaux VI.2 et VI.3) ou dans le cas d'un traitement thermique seul (tableau VI.3). Le module élastique augmente avec la fraction volumique de lipides pour chacune des conditions de force ionique et de procédé. Cette évolution n'est cependant significative qu'à partir d'une fraction volumique de 25 %.

Dans le cas **des gels prétraités par la mTG**, la présence de lipides permet d'obtenir un gel faible dès 7 % de lipides (v/v) pour une force ionique de 0,5 mol/L, quand la même concentration en protéines ne permettait pas de former un gel en l'absence de lipides. Comme observée plus tôt (tableau VI.1), les valeurs concernant l'échantillon à 7 % (v/v) et 0,8 mol/L de NaCl présentent une variabilité importante, qui peuvent être attribuées au fait que la concentration en protéines est proche de la concentration limite de gélification. La variabilité des résultats obtenus ne permet pas ici de les discuter. À partir de 25 % de lipides (v/v), le gel se forme lors du traitement enzymatique, et le module de conservation en fin de prétraitement enzymatique augmente significativement avec la concentration en lipide et la force ionique. Ainsi, alors qu'il n'était pas possible de mettre en évidence une différence de vitesse maximale de structuration, le niveau du module élastique est dépendant de la concentration et ou de la nature des protéines en solution même si l'effet fraction volumique reste prépondérant. En revanche, alors que le module final est plus élevé en fonction de la teneur en lipides, l'effet de la force ionique sur le module n'est plus significatif suite au traitement thermique.

Du fait d'une grande variabilité, il n'est pas possible de mettre en évidence de différences significatives entre les propriétés à la rupture des gels.

Dans le cas d'un t**raitement thermique seul**, l'augmentation du module élastique avec la fraction volumique en lipides est plus importante à 0,8 mol/L qu'à 0,5 mol/L de NaCl. Cela pourrait suggérer que les interactions entre les protéines solubles et les protéines en surface des sphérosomes sont plus nombreuses ou plus forte pour les conditions à 0,8 mol/L que pour celles à 0,5 mol/L (Kirimlidou et al., 2017). Ces différences pourraient s'expliquer par les différences en termes de concentration en protéines solubles, plus importantes à 0,8 mol/L, ou par des interactions plus fortes entre les protéines en surface des sphérosomes et les arachines (plus concentrées à 0,8 mol/L) qu'avec les conarachines

(plus concentrées à 0,5 mol/L). A 0,8 mol/L, un écrantage des charges de surfaces des sphérosomes peut également favoriser des interactions (Hao et al., 2016), avec les protéines en solution ou avec d'autres protéines présentent à la surface d'autres sphérosomes, conduisant à des interactions directes entre sphérosomes. Bien que l'on observe une diminution de la LVE et du seuil d'écoulement avec l'augmentation de la fraction volumique de sphérosomes, la variabilité des meures ne permet d'observer une diminution significative qu'à une fraction volumique de 40 %. Cette diminution est également observée sur des gels de protéines sériques en présence d'émulsion d'huile d'arachide stabilisées par des protéines laitières (Rosa et al., 2006).

Tableau VI.2 : Impact de la fraction volumique en gouttelettes lipidiques sur les propriétés rhéologiques de gels de protéines d'arachide formés par prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique. Les différences significatives < 0,05) entre échantillons d'une même ligne sont indiqués par des lettres différentes en exposants

Force ionique	***0,5 mol/L***				***0,8 mol/L***			
$\Phi_{gouttelettes\ lipidiques}$ *(%)*	**0**	**7**	**25**	**40**	**0**	**7**	**25**	**40**
$G'_{fin\ traitetement\ mTG}$	-	-	1,1±0,8^{a}	9,3±2,7^{b}	-	-	4,4±3,8^{ab}	17,6±5,3^{bc}
G'_0 *(Pa)*	-	<3^{a}	43±25^{ab}	80±9^{b}	-	*	40±22^{ab}	80±18^{b}
Tan δ (-)	-	0,41±0,12^{ab}	0,2±0,01^{b}	0,16±0,02^{b}	-	*	0,18±0,06^{b}	0,20±0,01^{b}
LVE (%)	-	49,1±34,8^{a}	7,3±0,1^{a}	8,6±3,3^{a}	-	*	21,1±28,5^{a}	4,7±0,7^{a}
Déformation à l'écoulement (%)	-	75±37^{a}	95±53^{a}	159±47^{a}	-	*	142±71^{a}	287±312^{a}

** La condition à 7 % de lipides à 0,8 mol/L est proche de la limite de gélification, ce qui se traduit par une grande variabilité des résultats, que nous avons choisi de ne pas présenter ici*

Tableau VI.3: Impact de la fraction volumique en gouttelettes lipidiques sur les propriétés rhéologiques de gels de protéines d'arachide formés par traitement thermique. Les différences significatives (p < 0,05) entre échantillons d'une même ligne sont indiquées par des lettres différentes en exposants

Force ionique	***0,5 mol/L***				***0,8 mol/L***			
$\Phi_{gouttelettes\ lipidiques}$ *(%)*	**0**	**7**	**25**	**40**	**0**	**7**	**25**	**40**
G'_0 *(Pa)*	22±11^{a}	30±5^{ab}	39±6 ^{ab}	63±2^{c}	18±10^{a}	24±8^{a}	49±8^{bc}	92±20^{d}
Tan δ (-)	0,18±0^{a}	0,19±0,01^{a}	0,19±0,01^{a}	0,22±0^{b}	0,19±0,03^{a}	0,19±0,01^{a}	0,18±0^{a}	0,21±0,02^{b}
$G'_0/G'_{fraction\ intermédiaire}$	-	1,4±02^{a}	1,6±0,4^{a}	2,8±0,1^{b}	-	1,3±0,5^{a}	2,7±0,4^{b}	5,0±1,0^{c}
LVE (%)	57±46^{a}	5,0±0,5^{a}	7,9±0,9^{b}	4,1±0,5^{c}	9±3,0^{a}	16,4±15^{a}	11,1±2,7^{a}	2,7±0,4^{d}
Déformation à l'écoulement (%)	220±49^{a}	135±62^{ab}	75±37^{ab}	48±8^{b}	122±12^{ab}	92±27^{ab}	92±6^{ab}	47±24^{b}

Comme suggéré, cette augmentation du module élastique du gel avec l'augmentation de la fraction volumique en lipides peut s'expliquer par la formation de points de jonction entre les sphérosomes et le réseau protéique, ou par la formation d'un réseau de gouttelettes lipidiques (Line et al., 2005; Ye and Taylor, 2009). Pour étudier l'effet de renforcement du module de conservation du fait de, l'équation de Van der Poel a été développée d'après les travaux de Brinkman et de van Vliet. Elle considère que le renforcement d'une suspension par l'ajout d'une particule s'effectue par le même facteur que lors de l'ajout d'une même particule dans un solvant pur pour lequel l'équation d'Einstein est vraie. Ces équations suggèrent que la phase dispersée est plus rigide que la phase continue. L'équation s'énonce comme suit (van der Poel, 1958) :

$$\frac{G'}{G'_m} = \left(\frac{1}{(1-\phi)}\right)^{2,5} \qquad (22)$$

On compare en figure VI.2 l'effet de renforcement observé (symbolisé par le rapport $G'/G'_{\text{fraction intermédiaire}}$) aux modèles théoriques de Van der Poel et de Eilers et Van Dijck pour des particules rigides (ratio $G'_{\text{particules}}/G'_{\text{matrice non gélifiée}}>10$). Comme la fraction intermédiaire seule n'a pas gélifiée lors de l'utilisation d'un prétraitement enzymatique, on ne présente que les résultats obtenus avec le procédé de traitement thermique pour les deux forces ioniques. On observe que nos échantillons semblent suivre les modèles cités plus haut. Les échantillons à 0,8 mol/L (en rouge) semblent mieux y correspondre que les échantillons 0,5 mol/L (en bleu), or nous avons vu dans le tableau VI.2 que la différence de ratio G'/G'_m entre les échantillons gélifiés à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L n'était pas significative. On considère donc que les sphérosomes sont bien plus rigide que la fraction intermédiaire gélifiée, et qu'ils sont en interaction avec le réseau protéique. Davantage de points de mesure seraient cependant nécessaire pour mettre en évidence une éventuelle différence entre les deux conditions de force ionique. Cette correspondance avec le modèle confirme l'une de nos hypothèses à savoir que les sphérosomes interagissent avec les protéines de la fraction intermédiaire, probablement par le biais des oléosines en surface de leur membrane dans le cas de traitement thermique au moins.

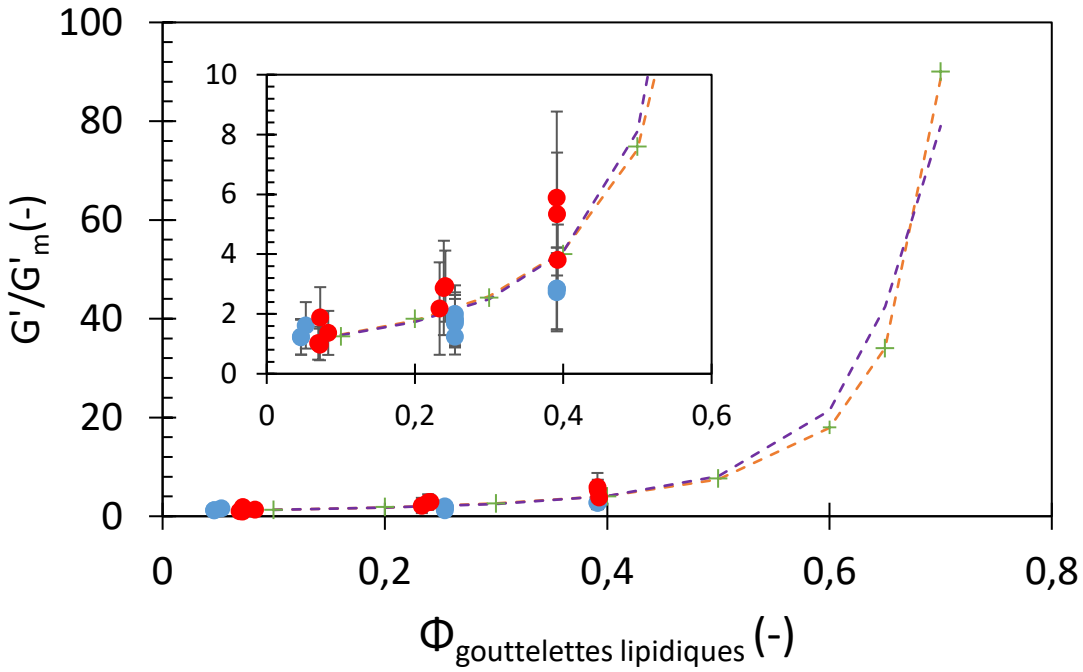


Figure VI.2 : Renforcement des gels par une phase dispersée. Données expérimentales sur les gels thermiques formées à 0,5 mol/L (ronds bleus) et à 0,8 mol/L (ronds rouges). En orange :modèle de Eilers et Van Dijck ; En vert : mesures d'Eilers (Eilers, 1941) ; En violet : calculs théoriques de Van der Poel d'après l'équation de Brinkman (van der Poel, 1958). L'insert est un focus sur la zone G'/G'$_m$<10.

VI.1.3 Etude de la microstructure

La microstructure des gels a été étudiée par microscopie confocale laser. Les gels ont été formés en batch dans les mêmes conditions de traitement thermique et de prétraitement enzymatique en utilisant des chauffages au bain-marie. Douze photos ont été prises pour chacune des conditions, mais seule l'image la plus représentative est présentée ici. Les protéines sont marquées en vert et les lipides en rouge. Ainsi sur les photos obtenues par superposition des images acquises avec les filtres spécifiques de chacun des marqueurs, une coloration orange est observée lorsque les protéines et les lipides sont co-localisés. Des éléments sphériques apparaissent en noirs sur certaines images, des observations à d'autres plans focaux que celui de l'image ont permis de montrer qu'il s'agit en fait de gouttelettes lipidiques situés à différents plans focaux. Par ailleurs il est observé sur le signal obtenu avec le filtre des lipides (images de la lignes B des figures VI.3. et VI.4) , des éléments qui apparaissent rouge malgré l'absence de lipides. Cela est observé avec une intensité du laser très élevée, 4 à 10 fois celles utilisés pour les échantillons riches en lipides. Même si le marqueur est spécifique des lipides, il semble pouvoir interagir avec les protéines. On observe en effet que ce sont les mêmes zones qui sont marquées entre les images A et B. La luminosité et le contraste des images présentant la répartition du marqueur spécifique des lipides a été saturée pour une meilleure représentation. L'hétérogénéité

de notre système appelle à une certaine prudence lors de l'analyse des images, cependant, nous avons identifié quelques évolutions qui semblent suffisamment marquées pour être signalées. Les différents échantillons ont également été observés par microscopie confocale avant gélification (annexe V).

L'effet de la concentration en lipides sur la microstructure est analysé sur les gels obtenus à 0,5 mol/L, par traitement thermique (figure VI.3) ou traitement enzymatique suivi du traitement thermique (figue VI.4). L'effet de la force ionique pour les 2 conditions de gélification n'est analysé que pour la plus forte fraction volumique en sphérosomes pour laquelle les systèmes ont gélifié (figure VI.5).

On observe à l'issue du traitement thermique la formation d'un réseau, qui semble similaire quel que soit la fraction volumique en lipides. Dès 7 % de lipides, on observe l'apparition d'agrégats lipidiques, en surbrillance rouge dans les images de la ligne B, dont la concentration augmente avec la fraction volumique de lipides dans l'échantillon. Entre 7 % et 25 % de fraction volumique, ces agrégats augmentent en nombre et en tailles, mais demeurent isolés. Ces agrégats de lipides confortent l'hypothèse d'interaction entre les gouttelettes. La coloration orange sur l'image superposée appuie l'hypothèse également d'agrégats enchâssés dans le réseau. On peut observer à 40 % de lipides un réseau d'agrégats de sphérosomes. Le réseau protéique est plus difficile à observer mais la co-localisation mise en évidence sur l'image superposée confirme notre hypothèse que le renforcement du gel observé en rhéologie est dû à une interaction entre le réseau protéique formé et les gouttelettes/agrégats lipidiques. Les modules plus importants observés à 40 % de fraction volumique (63 Pa en moyenne) pourraient s'expliquer par un réseau de lipides enchâssé dans la matrice protéique.

Concernant les gels ayant subis un prétraitement enzymatique en amont du traitement thermique, on observe également l'apparition d'agrégats lipidiques enchâssés dans le réseau, ce qui suffirait donc à renforcer le réseau de protéines pour former un gel si l'on s'en réfère aux résultats de rhéologie. On retrouve pour ce procédé également une augmentation forte du module (tableau VI.3) lorsque les gouttelettes forment un réseau, ici à partir de la condition 25 % et au-delà (figure VI.4). L'analyse des images a permis d'observer une taille moyenne similaire de gouttelettes entre les conditions à 25 % et à 40 % de fraction volumique en lipides, avec des sphérosomes de diamètres respectivement compris 1 et 5 µm. On observe cependant quelques sphérosomes plus gros de taille comprise entre 5 et 20 µm (observée en traitement thermique seul et en prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique). La présence de sphérosomes de plus grande taille à 40 % semble indiquer qu'il y a eu coalescence de sphérosome. Cette coalescence peut s'expliquer par plusieurs hypothèses, telle que la différence de préparation de l'échantillon. En effet, le surnageant à 77 % en lipides a tout d'abord été séparé du mix original par centrifugation avant d'être mélangé avec de la fraction

intermédiaire alors que les autres échantillons ont été récupérés directement après centrifugation. Cette forte concentration en gouttelette dans le surnageant pourrait aussi favoriser leur agrégation par interaction hydrophobe entre les protéines en surface, pouvant conduire à la coalescence des sphérosomes (Karefyllakis et al., 2019). Iwanaga et.al (2007) suggèrent également qu'à un pH proche de 4 (pHi des sphérosomes) ou à une force ionique supérieure à 0,05 mol/L, les sphérosomes extraits de soja s'agrègent du fait d'une diminution des forces de répulsions. Les méthodes de caractérisation mise en œuvre, par mesure de taille par granulométrie, ne permettent pas d'exclure également une coalescence (Iwanaga et al., 2007).

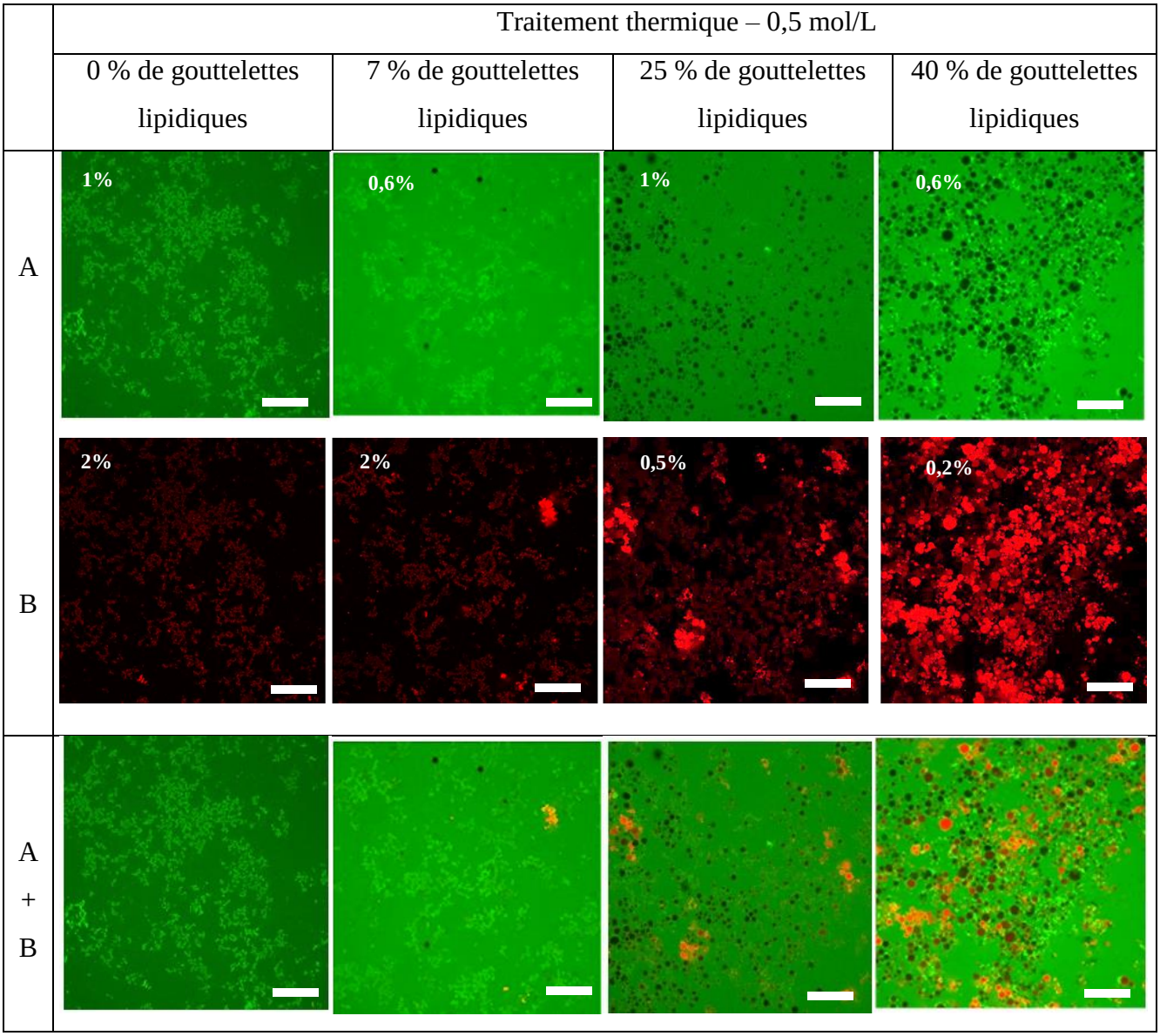


Figure VI.3: Observation en microscopie confocale de suspensions de protéines d'arachide extraites et gélifiées par un traitement thermique seul à 0,5 mol/L et contenant ϕ=0 % ;7 % ; 25 % et 40 % de gouttelettes lipidiques. Les protéines sont marquées en vert (image A) et les lipides en rouge (image B). L'intensité du laser au moment de la capture est indiquée en haut à gauche de chaque image à titre informatif. Echelle : 50 µm

Les gouttelettes lipidiques sont réparties de façon plus uniforme (moins agrégées) lorsqu'un prétraitement enzymatique est appliqué. Cela pourrait confirmer que les gouttelettes sont liées entre elles par l'intermédiaire des protéines pendant le traitement enzymatique. Le réseau alors formé pendant le traitement enzymatique pourrait ensuite empêcher ou limiter l'agrégation des sphérosomes pendant le traitement thermique (figure VI.4)

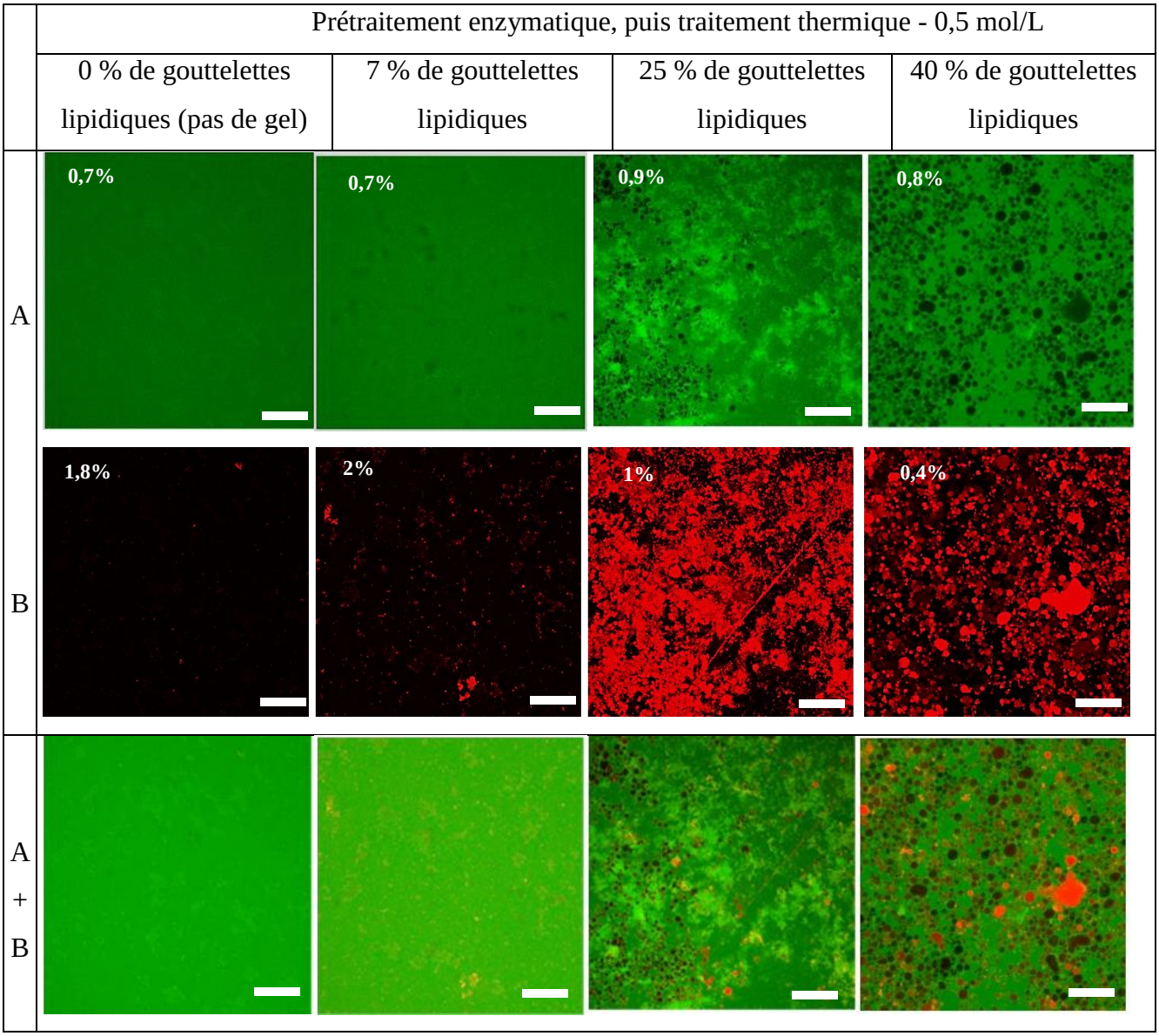


Figure VI.4: Observation en microscopie confocale de suspensions de protéines d'arachide extraites et gélifiées par un prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique à 0,5 mol/L et contenant ϕ=0 % ;7 % ; 25 % et 40 % de gouttelettes lipidiques. Les protéines sont marquées en vert (image A) et les lipides en rouge (image B). L'intensité du laser au moment de la capture est indiquée en haut à gauche de chaque image à titre informatif. Echelle : 50 µm

Les images obtenues pour les gels avec 40 % de lipides aux 2 forces ioniques ne mettent pas en évidence de différence en fonction de la force ionique, quel que soit le procédé de gélification (figure VI.5).

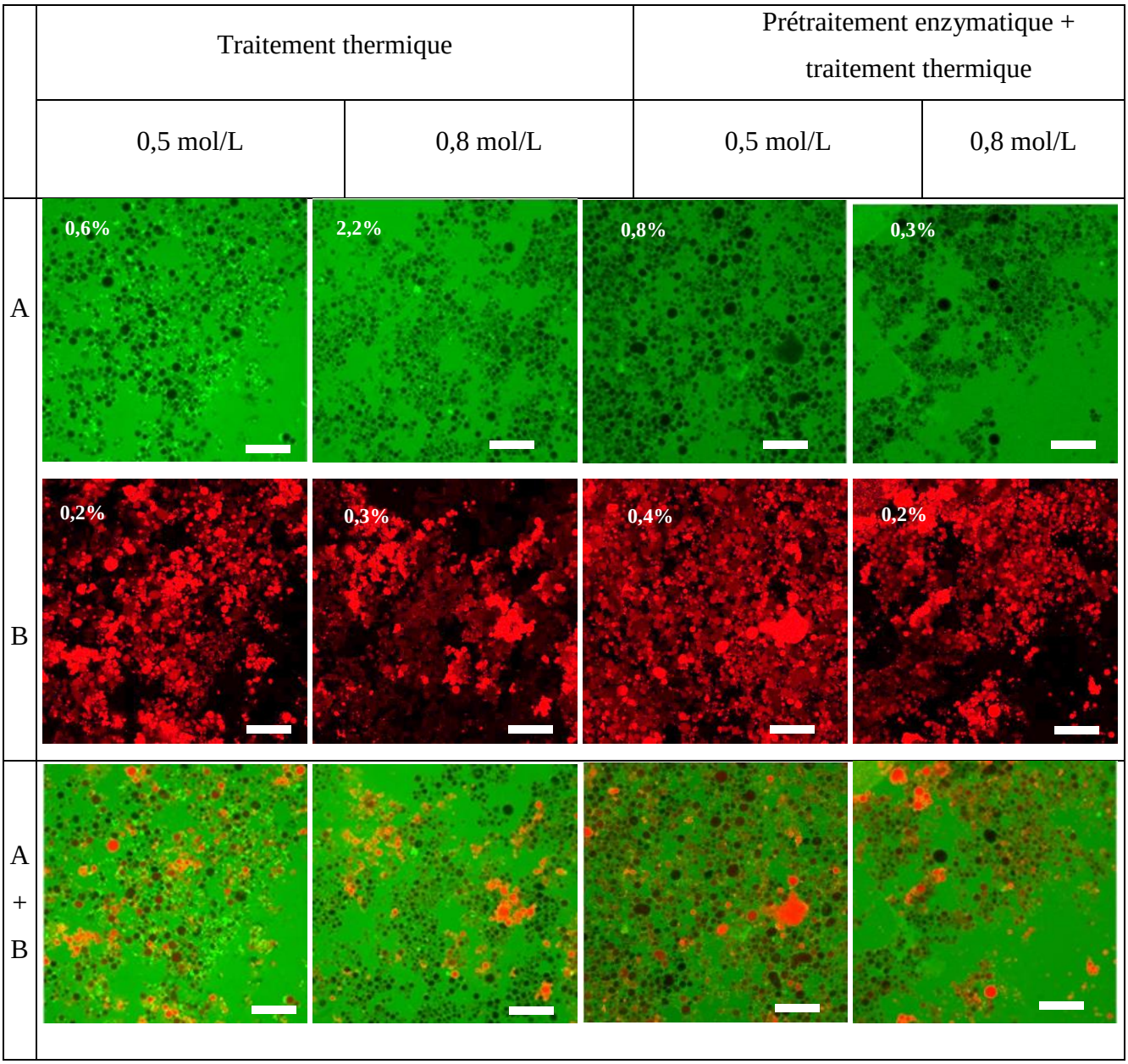


Figure VI.5: Observation en microscopie confocale de suspensions de protéines d'arachide extraites et gélifiées à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L de NaCl, en présence d'une fraction volumique de lipides de 40%. L'observation est faite sur l'échantillon gélifié par un traitement thermique seul et par un prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique. Les protéines sont marquées en vert (image A) et les lipides en rouge (image B). L'intensité du laser au moment de la capture est indiquée en haut à gauche de chaque image à titre informatif. Echelle : 50 µm

VI.2 Etude de la gélification du culot en présence ou non de protéines solubles

En présence d'une fraction volumique de lipides de 25 % (correspondant à celle trouvée dans le mix sans prise en compte du culot), les modules conservatifs obtenus pour les différentes conditions de traitement et de force ionique sont de l'ordre de 40-50 Pa. Ces modules restent cependant bien inférieurs à ceux obtenus pour les mix, dont les valeurs sont supérieures à 250 Pa lors d'une gélification par traitement thermique et vont de 500 jusqu'à 1800 Pa lorsqu'un prétraitement enzymatique a été appliqué.

Ces données suggèrent que la fraction insoluble (le culot), qui représente environ 31 % de la masse sèche du mix, joue un rôle important dans les propriétés mécaniques du gel. La masse sèche du culot est principalement constituée de polyoses (hétéropolyoses, amidon, fibres insolubles ; 53 % p/p), de protéines insolubles (29 % p/p) et de lipides (18 % p/p) (tableau IV.2).

Les hypothèses préliminaires que nous pouvons avancer sont:

- Le traitement thermique à 95°C va conduire à la gélatinisation de l'amidon contenu dans le culot. En cas de solubilisation de l'amylose et de l'amylopectine, un gel peut se former au refroidissement par rétrogradation, ce qui est susceptible d'influencer sur les propriétés physiques des gels (Ai et Jane, 2015; Genccelep et al., 2015)
- Une dispersion de polyoses est capable de renforcer la structure d'un gel thermique de protéines par interactions électrostatiques entre les polyoses et les protéines (Chen et al., 2016; Nieto et al., 2016) ou séparation de phase par concentration de la phase gélifiée (Le et al., 2017)
- Les constituants insolubles, plus rigides que la fraction intermédiaire et de fractions volumiques plus importantes que la fraction lipidique, renforcent le gel selon le modèle présenté en figure VI.2

On a donc cherché dans un premier temps à savoir dans quelle mesure le culot, obtenu par centrifugation à 10 000 g pendant 2 h à partir d'un mix préparé à 0,5 mol/L de NaCl, était capable de former un gel en l'absence des protéines de la fraction intermédiaire.

Le culot à 41,6 % de matière sèche emprisonne en fait une certaine quantité de fraction intermédiaire, laquelle contient des protéines solubles. Afin d'éliminer au maximum ces protéines solubles et pouvoir ainsi étudier l'effet de la seule fraction insoluble, le culot a été lavé avec des solutions de 0,5

mol/L de NaCl. Le culot ainsi lavé est resuspendu dans un volume de solution de NaCl 0,5 mol/L identique au volume de surnageant obtenu après centrifugation selon le protocole décrit dans la section matériel et méthode. L'opération est répétée trois fois. On appellera par la suite « C1+NaCl » l'échantillon obtenu par la redispersion du culot issu de la première centrifugation du mix (C1) dans une solution de NaCl, « C3+NaCl » l'échantillon obtenu après deux lavages du culot et dispersé dans une solution de NaCl. Un échantillon « C1+I » obtenu par la redispersion du culot issu de la première centrifugation du mix (C1) dans la phase intermédiaire sera également testé pour évaluer la contribution des protéines solubles. Ces échantillons ont par la suite été traités par traitement thermique, précédé ou non d'un prétraitement enzymatique. En raison de la composition du culot en éléments insolubles, la stabilité vis-à-vis de la sédimentation des différents échantillons pendant le temps de traitement appliqué a été suivi par mesure de turbidité par rétrodiffusion. Nous nous sommes assurés que les échantillons étaient stables et ne sédimentaient pas lorsqu'ils sont maintenus à 40°C pendant 3 h (temps de traitement enzymatique) ou 40 min à 95°C. A 40°C, l'échantillon C3+NaCl sédimente au bout de 10 min. Cet échantillon n'a donc pas été étudié pour les essais avec prétraitement enzymatique. Pour l'étude en traitement thermique en rhéologie, l'échantillon C3+NaCl préalablement chauffé à 25 °C en dehors du système de mesure. Lors de la mesure en rhéologie, l'échantillon est alors directement chauffé de 25°C à 95°C sans l'étape initiale de maintien à 25 °C pendant 10 min. Les autres échantillons se sont avérés stables à 60°C et à 40°C pendant au moins 3 h. Cette différence de comportement entre les échantillons C3+NaCl et C1+NaCl à 40°C n'a pas pu être reliée à une différence de taille des particules entre les deux culots (vérifiée par granulométrie), ni à une différence significative de viscosités des phases continues des différents échantillons (1,6±0,05 Pa.s).

VI.2.1 Etude de la capacité gélifiante du culot

Les protéines, notamment les protéines solubles, sont un élément important dans l'étude de la gélification. Le culot C1 renferme une certaine quantité de fraction intermédiaire piégée, et donc de protéines solubles, qui peuvent être éliminées par différents lavages. Le culot contient également des protéines insolubles. Pour évaluer ces quantités, la teneur en matière sèche, la teneur en protéine solubles (mesurées dans la fraction intermédiaire ou dans la solution de NaCl après dispersion du culot) et la quantité de protéines insolubles ont été mesurées (figure VI.6 et tableau VI.4).

La diminution de la masse sèche entre les échantillons C1+NaCl et C3+NaCl témoigne d'une solubilisation d'éléments contenus dans le culot. L'échantillon remis en suspension dans la fraction

intermédiaire présente lui une masse sèche plus importante que les autres, ce qui peut être attribué aux protéines contenues dans la fraction intermédiaire ainsi qu'à quelques lipides résiduels (moins de 1 %).

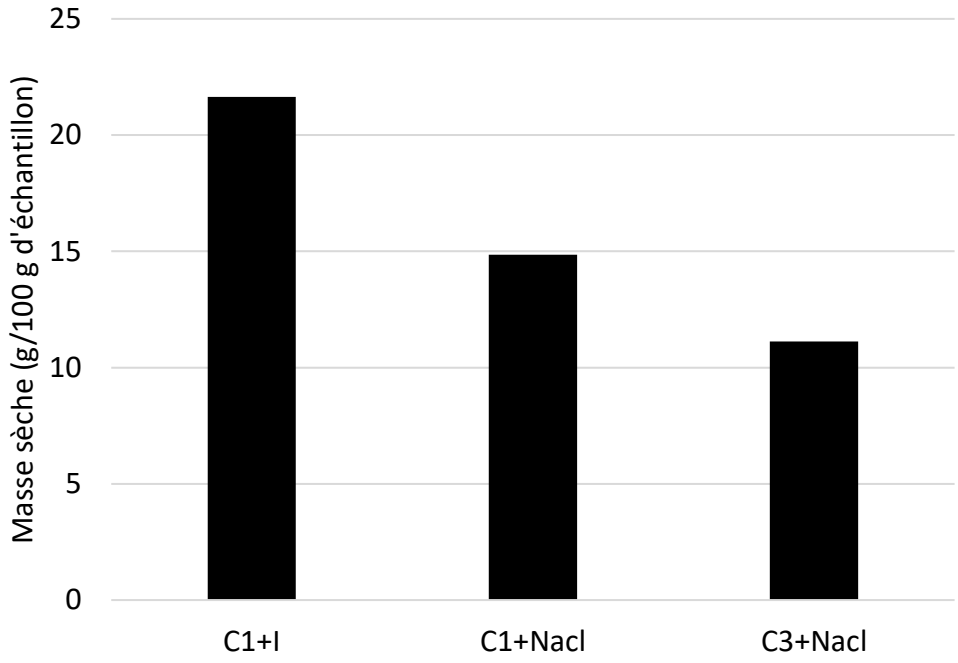


Figure VI.6 : Masse sèche des différents échantillons formés à partir de culots (C1) issus d'une première centrifugation du mix suspendus dans de la fraction intermédiaire (I) extraite à 0,5 mol/L ou dans une solution (de même volume que la fraction intermédiaire) de NaCl à 0,5 mol/L, et de culots lavés à deux reprises (C3) remis en suspension dans une solution de NaCl à 0,5 mol/L

Les protéines représentent entre 26 et 30 % de la matière sèche (Tableau VI.4.). On constate que ce pourcentage diminue au cours des lavages du culot. Il y a donc solubilisation de protéines au cours des lavages dans les phases salines surnageantes qui sont éliminées entre les lavages. La quantité totale de protéines diminue logiquement entre C1+I et C1+NaCl du fait de l'élimination de la fraction intermédiaire. On constate dans l'échantillon C1+NaCl une quantité de protéines solubles correspondant en partie à des protéines solubles contenues dans de la fraction intermédiaire piégée dans le culot mais probablement aussi à une solubilisation de protéines. Cette probable solubilisation est démontrée par la présence de protéines solubles en quantité non négligeable dans l'échantillon C3+NaCl. En effet, on solubilise ici à partir du broyat 40 % des protéines de l'arachide, tandis qu'il devrait être possible d'en solubiliser plus de 80 % (Kain et al., 2009)

L'élimination des protéines au cours des lavages ne pouvant à elle seule expliquer la diminution de 3,5 points de la matière sèche, il y a donc solubilisation d'un autre élément du culot, probablement des glucides, ou une perte de matière.

Les concentrations en protéines solubles des échantillons C1+NaCl et C3+NaCl sont à priori insuffisantes pour former des gels, si l'on s'en réfère aux résultats obtenus précédemment sur des gels formés à partir de lyophilisat de protéines extraites à 0,5 mol/L (chapitre V). En conséquence, si des gels pouvaient être formés à partir de ces solutions, d'autres constituants que les protéines solubles devraient être impliqués.

Tableau VI.4 : Concentration massique de protéines solubles (quantifiées dans la phase aqueuse), insolubles (quantifiées dans le culot) et totales et quantité en pourcent de la matière sèche*

g de protéines pour 100 g de suspension	C1+I	C1+NaCl	C3+NaCl
Protéines solubles	2,5	1,6	1,7
Protéines insolubles	3,9	2,5	1,2
Protéines totales	6,4	4,1	2,9
% de la matière sèche	29,6	27,4	25,9

**les protéines totales ont été quantifiées par Kjeldahl, les protéines solubles par mesure de l'absorbance à 280 nm et les protéines insolubles par calcul de la différence*

Les trois échantillons ont été soumis aux deux traitements de gélification, thermique ou enzymatique puis thermique. La figure VI.7 présente les courbes moyennes d'évolution des modules des échantillons gélifiés en triplicat. On observe que tous les échantillons gélifient, avec ou sans les protéines solubles de la fraction intermédiaire du mix.

Tous les échantillons gélifiés thermiquement présentent un profil similaire, avec un premier plateau lors de la phase de chauffe puis un second plateau après refroidissement, caractéristique de la formation d'un gel dont la cinétique de gélification est finie. L'obtention d'un même profil avec ou sans phase intermédiaire, et ce malgré une faible concentration en protéine soluble, démontre que la fraction insoluble du culot est suffisante pour permettre la structuration du gel. Une solubilisation à chaud des protéines du culot peut être envisagée, cependant, la faible concentration en protéine totale de l'échantillon C3+NaCl, inférieure à la concentration limite de gélification déterminée dans le chapitre IV, ne permet pas d'étayer complétement cette hypothèse. L'amidon et les autres glucides complexes présents dans le culot doivent donc contribuer au développement des systèmes gélifiés. Au cours du chauffage, l'amidon peut gélatiniser et rétrograder au moment du refroidissement pour former un gel. Par ailleurs, Liu et. al (2016) ont montré que des polyoses présents dans une farine d'arachide délipidée pouvaient être extraits par chauffage à partir de 50°C avec un optimum à 85°C. Ces hétéropolymères contiennent des oses neutres (glucose, arabinose, xylose) et des acides uroniques. En ce sens, ils peuvent être apparentés aux polyoses (gomme de lin) pour lesquels Chen

et al. (2016) ont démontré une interaction lors de la gélification d'isolat de protéines d'arachide. Enfin, il peut être raisonnable de penser que l'amidon et les polysaccharides peuvent mobiliser de l'eau pendant le chauffage entrainant de fait une augmentation de la concentration en protéines, induisant alors des conditions favorables à la formation d'un réseau protéique (Wu et al., 2020)

Les vitesses maximales de structuration lors d'un traitement thermique seul, sont observées à une température plus faible pour l'échantillon C1+I (76°C) que pour les deux autres échantillons C1+NaCl et C3+NaCl (93°C) (tableau VI.5). Cette différence pourrait s'expliquer par l'apport des protéines de la fraction intermédiaire. Cela implique que les protéines permettent de former plus rapidement un gel plus élastique, mais n'ont pas d'effet sur la vitesse maximale de structuration du gel, à cette concentration en protéines.

Pour les échantillons prétraités par la mTG, seuls les culots obtenus après la première centrifugation et repris dans une solution de NaCl ou dans la fraction intermédiaire du mix, ont pu être testés. On observe une gélification (G'>G'') pendant le traitement enzymatique pour les 2 systèmes étudiés (Figure VI.7). Contrairement au traitement thermique, la spécificité de la réaction enzymatique vis-à-vis des protéines permet de souligner que la structuration des 2 systèmes met bien en jeu les protéines.

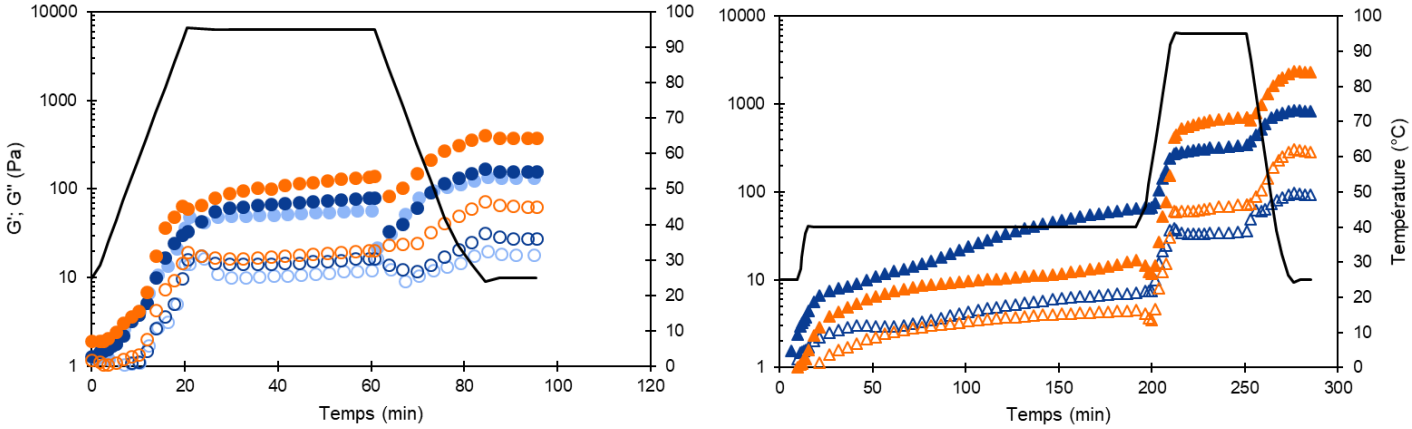


Figure VI.7: Evolution du module élastique G' (symboles pleins) et visqueux G'' (symboles vides) au cours de la gélification de suspension C1+I (orange), C1+NaCl (bleu foncé) et C3+NaCl (bleu clair) extraites et préparées à 0,5 mol/L. A gauche: traitement thermique seul. A droite: Prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique. Les profils de températures sont représentés par une ligne noire continue (axe de droite).

De façon surprenante au regard de la quantité de protéines, on observe un gel plus élastique pour la condition C1+NaCl lors du traitement enzymatique. En revanche le module de conservation du gel obtenu à partir de C1+I augmente davantage lors du traitement thermique, au point de dépasser celui des échantillons C1+NaCl. Cela pourrait s'expliquer par une plus grande spécificité de la

transglutaminase vis-à-vis des protéines solubilisées suite à la suspension du culot dans une solution de NaCl en comparaison aux protéines contenues dans la fraction intermédiaire. La vitesse maximale de structuration est significativement plus importante à ce stade du procédé pour l'échantillon C1+NaCl mais cette structuration survient au même temps.

Pendant l'étape de traitement thermique après le traitement enzymatique, la vitesse maximale de structuration du système préalablement gélifié intervient à plus basse température (77°C contre ~90°C) pour l'échantillon mis en suspension dans la phase intermédiaire (C1+I) que pour l'échantillon mis en suspension dans une solution de NaCl (C1+NaCl). Le traitement thermique semble plus structurant que le traitement enzymatique.

Tableau VI.5: Valeur, température et temps d'apparition de la vitesse maximale de structuration des gels formés à 0,5 mol/L de force ionique à partir de culot mélangés à une fraction intermédiaire (en orange), à une solution de NaCl (en bleu foncé) et de culot lavé deux fois par des solutions de NaCl et dispersée dans la deuxième solution de lavage. Les culots et fractions intermédiaires ont été extraits à 0,5 mol/L. La significativité des résultats est calculée sur des triplicats par le test de Student. Deux conditions sont considérées différentes pour p<0,051

Echantillon	Vitesse maximale de structuration	Traitement thermique seul	Prétraitement enzymatique	Traitement thermique post-traitement enzymatique
C1+I	dG'/dt (Pa/min)	$9,5\pm1,2^{a}$	$0,27\pm0,07^{b}$	$131,3\pm44,5^{d}$
	Température (°C)	$76,5\pm0,4^{a}$	40 ± 0^{c}	$77,8\pm5,4^{a}$
	Temps (min)	$24,7\pm0,2^{a}$	$18,5\pm1,7^{c}$	$206,7\pm3,3^{d}$
C1+NaCl	dG'/dt (Pa/min)	$11,2\pm3,4^{a}$	$0,45\pm0,09^{c}$	$39,8\pm7,5^{e}$
	Température (°C)	$93,3\pm1,6^{b}$	40 ± 0^{c}	$90,3\pm2,1^{b}$
	Temps (min)	$30,4\pm2^{b}$	$17,2\pm1,2^{c}$	$209,2\pm0,6^{d}$
C3+NaCl*	dG'/dt (Pa/min)	$13,7\pm4,0^{a}$		
	Température (°C)	$94,1\pm0,8^{b}$		
	Temps (min)	$19,8\pm0,5^{c}$		

**Cet échantillon n'a pas été maintenu à 25°C pendant 10 min avant chauffage, ce qui explique le décalage de 10 min pour la détermination du temps.*

VI.2.2 Propriétés rhéologiques des gels formés à partir du culot

Les modules de conservation et les valeurs de tan δ en fin de gélification, ainsi que les limites de linéarité viscoélastiques et les seuils d'écoulement à la déformation sont donnés en figure VI.8.

Les gels formés thermiquement à partir des culots dispersés dans une solution de NaCl (C1+NaCl et C3+NaCl), présentent un module élastique similaire (~100 Pa) qui reste cependant 3 fois plus faible que celui obtenu en présence de la fraction intermédiaire (C1+I) (figure VI.8 A). Ainsi même si le culot contribue, il y a un apport non négligeable des éléments solubles de la fraction intermédiaire du mix dont les protéines dans la structuration. Il est important de rappeler ici que la fraction intermédiaire conduit à un gel de module ~ 20 Pa.

A l'issu du procédé combinant pre-traitement enzymatique et traitement thermique, le module de conservation est également plus important pour l'échantillon du culot resuspendu dans la fraction intermédiaire contenant les protéines solubles malgré un effet du traitement enzymatique (e(TT)) moins efficace. La forte augmentation du module met en exergue l'effet important du traitement thermique et des phénomènes qui y sont associés et discutés précédemment. Pendant le traitement thermique, des protéines du culot, alors solubilisées, pourraient gélifier, ou les glucides complexes, amidon et autres, pourraient entrer en jeu dans la structuration du système.

Les niveaux de modules obtenus avec le prétraitement enzymatique sont significativement plus élevés que ceux obtenus par traitement thermique seul. Le caractère viscoélastique du gel, représenté par tan δ (figure VI.8 B), est significativement différent selon le procédé de gélification. La valeur tan δ est inférieure à 0,3 dès la fin du traitement enzymatique, ce qui confirme la présence d'un réseau gélifié dès cette étape.

Lorsqu'on regarde les propriétés des gels à la déformation (figure VI.8 C et D), on constate que le procédé eTT permet d'augmenter le domaine linéaire de viscoélasticité (LVE) probablement en lien avec la formation des liaisons isopeptidiques. Les différences entre les échantillons au sein d'un même procédé sont faibles. Concernant le seuil d'écoulement à la déformation, il est également plus important lors d'un prétraitement enzymatique, et il diminue significativement dans les échantillons resuspendus dans une solution de NaCl. Cela indiquerait que le réseau protéique ici est comparable avec celui étudié dans les matrices précédentes (protéines seules et protéines+sphérosomes). Il pourrait donc être assimilé à un gel colloïdal fort (davantage de conditions avec des concentrations différentes en protéines permettraient de confirmer cela) (Ikeda et al., 1999).

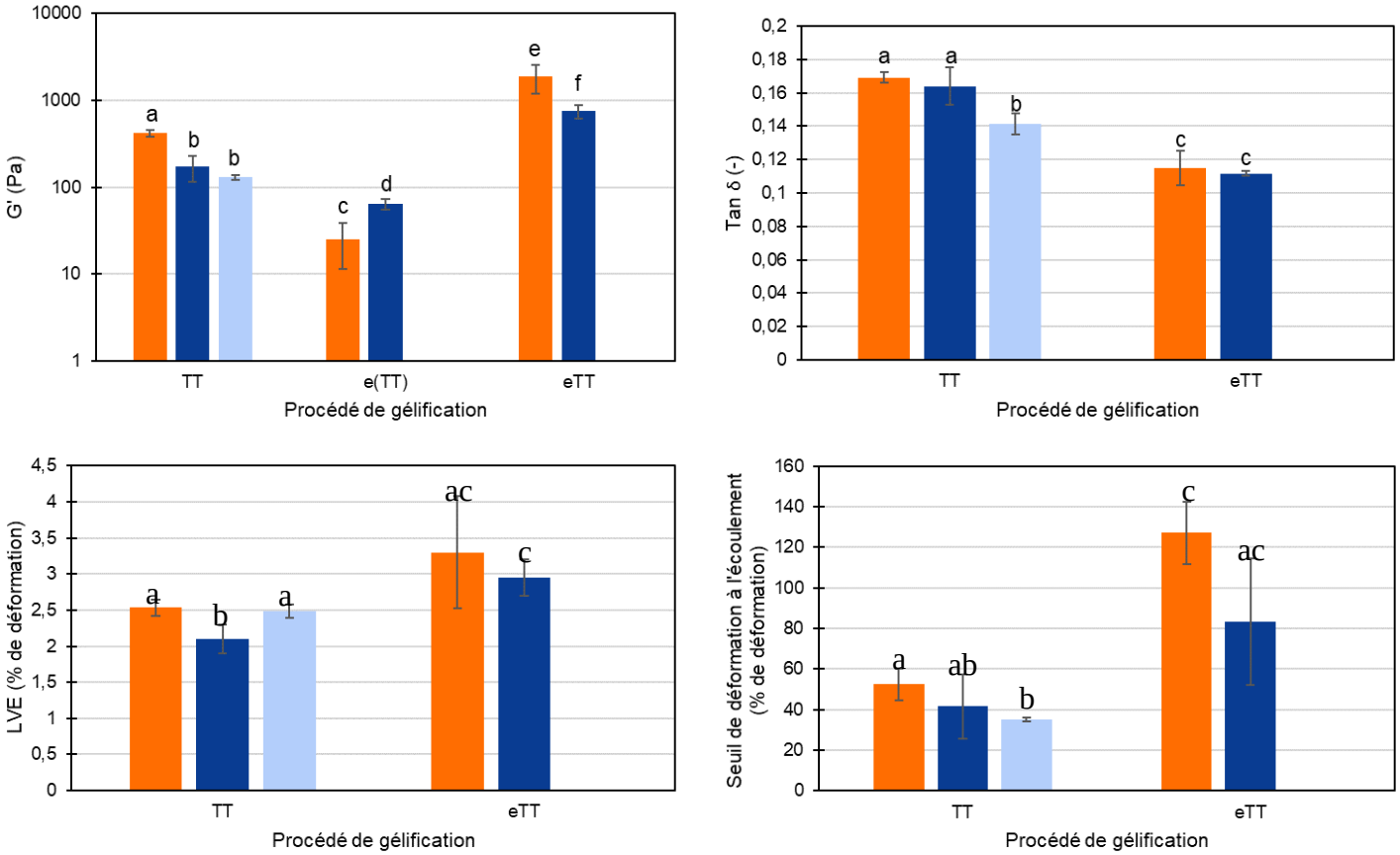


Figure VI.8: Etude des modules de conservation G' (A), des facteurs de perte tan δ (B), des limites de linéarité viscoélastique (C) et des seuils d'écoulement à la déformation (D) de gels formés à partir de culot mélangé à une fraction intermédiaire (en orange), à une solution de NaCl (en bleu foncé) et de culot lavé deux fois et dispersée dans une solution de NaCl (en bleu clair). Les culots et fractions intermédiaires ont été extraits à 0,5 mol/L. La significativité des résultats est calculée sur des triplicats par le test de Student. Deux conditions sont considérées différentes pour $p<0,05$

VI.2.3 Etude de la microstructure des gels

Seuls les gels formés à partir du culot obtenu à la première centrifugation (C1) remis en suspension dans la fraction intermédiaire (C1+I) ou une solution de NaCl (C1+NaCl) sont comparés d'un point de vue microstructure en fonction des traitements (TT ou eTT).

Les images de microscopie confocale des gels issus des échantillons C1+I et C1+NaCl ayant subi le même traitement ne permettent pas de différentier les échantillons en fonction de leur composition (figure VI.9. A/B ou C/D). Néanmoins, on observe des différences entre le traitement thermique et le traitement enzymatique (figure VI.9, A/C ou B/D). Comme observé sur les gels de protéines seules (figure V.5), le réseau obtenu par traitement thermique présente une structure particulaire alors que le réseau prétraité enzymatiquement présente une structure plus lisse et denses dans les zones protéiques en vert.

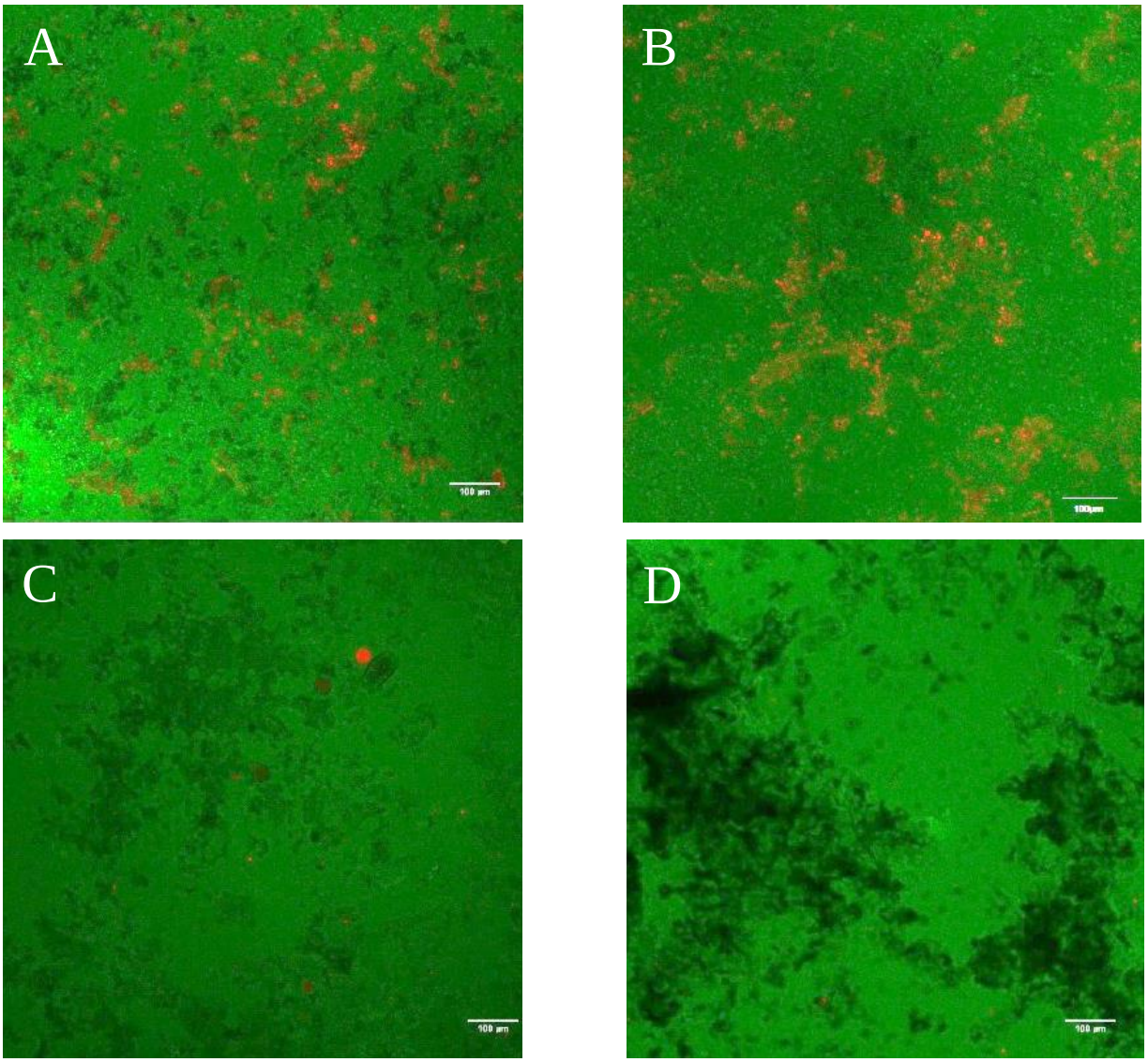


Figure VI.9: Observation en microscopie confocale de gels formés à partir de culots extraits et dispersés dans la fraction intermédiaire (A et C) et dans une solution de NaCl (B et D), à 0,5 mol/L de force ionique. Les échantillons ont été gélifiés par traitement thermique seul (A et B) et par traitement enzymatique suivi d'un traitement thermique (C et D). Les protéines sont marquées en vert et les lipides en rouge. Echelle : 100 µm

La contribution de l'amidon dans la structuration ayant été évoquée, des observations des gels ont été réalisées après coloration à l'iode (figure VI.10). Dans l'échantillon traité thermiquement (figure VI.10 A), on n'observe pas de grains d'amidon mais des zones violettes (indiquée par une flèche) témoin de la présence d'amylose ou amylopectine. Le traitement thermique à 95°C a induit une gélatinisation totale de l'amidon de l'arachide, dont la température de gélatinisation est proche de 75°C (Slade and Levine, 2006). Les zones violettes observées peuvent correspondre à de l'amidon rétrogradé suite au refroidissement. Lorsqu'il y a eu gélification pendant le prétraitement enzymatique, à une température inférieure à celle de la gélatinisation de l'amidon, nous pouvons

encore observer les grains d'amidons gonflés et hydratés après le traitement thermique. L'amidon n'a semble-t-il pas été totalement gélatinisé. Cela peut s'expliquer par une réduction de l'enthalpie de gélatinisation de l'amidon et une diminution de son gonflement du fait de son emprisonnement dans un réseau protéique (Lavoisier and Aguilera, 2019).

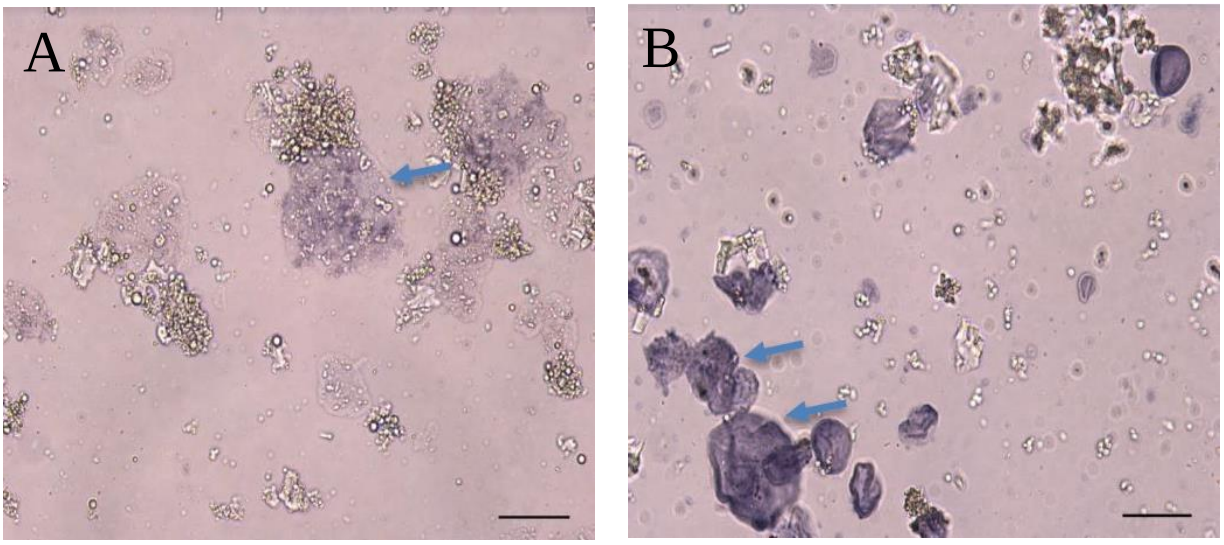


Figure VI.10 : Observation au microscope optique de gels obtenus à partir de culots dispersés dans une solution de NaCl à 0,5 mol/L de force ionique, gélifiés par traitement thermique (A) et par traitement enzymatique suivi d'un traitement thermique (B). Les gels ont été dilués et colorés à l'iode avant observation afin d'identifier l'amidon (indiqué par des flèches) en violet-noir. Echelle : 100 µm

La gélatinisation de l'amidon observée sur le culot C1 après le traitement thermique peut expliquer en partie le module conservatif mesuré. En effet, l'augmentation du module par ajout de la fraction intermédiaire soluble (x4) ne peut pas être expliqué par une contribution simple des protéines: le module d'un gel protéique issus de cette fraction intermédiaire n'est que de 20 Pa. Une hypothèse est donc que la gélatinisation de l'amidon a mobilisé de l'eau, conduisant à une augmentation de la concentration en protéines. Il n'est pas exclu que, les autres composants insolubles du culot soient susceptibles d'interagir avec le réseau, s'ils sont solubilisés pendant le traitement thermique, et de contribuer ainsi à son caractère élastique (Jiao et al., 2018a; Laneuville and Turgeon, 2008). Il peut s'agir de polyoses insolubles solubilisés lorsque la température dépasse 85°C, qui seraient alors disponibles pour interagir avec les protéines, notamment par interaction électrostatiques, et renforcer les propriétés élastiques du réseau gélifié (Tran and Rousseau, 2013; Uruakpa, 2012). Nous n'avons cependant pas à ce stade de l'étude pu le démontrer.

Dans le cas d'un prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique, la présence de grains d'amidon gonflés mais encore en partie intacts ne permet pas de conclure à une contribution de

l’amidon par formation d’un gel. Son rôle peut ici être considéré comme un élément dispersé dont la rigidité et le volume (suite au gonflement) peut contribuer à faire évoluer les propriétés des gels. Cependant son gonflement pendant le traitement thermique mobilise également de l’eau et peut contribuer à renforcer des interactions hydrophobes au sein du gel formé par traitement enzymatique. Il n’est peut-être pas à exclure ici encore une contribution au cours de l’étape de chauffage d’autres polyoses en interaction avec des protéines encore en solution comme évoqué pour le simple traitement thermique. Ce point reste cependant à démontrer.

Conclusions du chapitre

Les **sphérosomes** contenus dans la graine d'arachide **renforcent le réseau de protéines** lors de la formation d'un gel thermique ou enzymatique.

Ce renforcement des propriétés élastiques s'explique dans le cas des gels thermiques ($G' \sim 2G'_{matrice}$) par une **interaction entre les protéines de la fraction intermédiaire et les sphérosomes**, plausiblement *via* des interactions protéines-protéines avec les protéines en surface de ces derniers.

L'ajout de la fraction lipidique contenant ces sphérosomes et leur intégration dans le réseau de protéines **permet de gélifier une solution de protéines par traitement enzymatique** suivi d'un traitement thermique, ce qui n'était pas possible pour une solution de protéines à même concentration en protéines solubles.

Les constituants du culot (protéines insolubles, polyosides) peuvent former un gel au cours des traitements utilisés, **indépendamment de la fraction protéique soluble**.

Ces éléments par mobilisation d'une partie de l'eau ou par interaction avec les protéines solubles contribuent fortement aux propriétés du gel de suspension de graines d'arachides broyées.

Lors d'un traitement thermique seul, l'amidon est gélatinisé puis rétrogradé dans le gel, tandis que lorsqu'on ajoute un **prétraitement enzymatique**, la **gélatinisation de l'amidon** lors du traitement thermique est **limitée** et les grains d'amidons sont alors présents, gonflés, et occupe ainsi une fraction volumique importante.

Conclusion générale et perspectives

Ce projet de recherche avait pour objectif d'étudier les relations entre conditions de procédés (extraction de protéines et gélification), mécanismes de structuration et propriétés texturales d'une matrice gélifiée à base d'arachide, légumineuse ayant un intérêt nutritionnel important dans les pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud. Cette étude s'inscrit dans la continuité de travaux préliminaires conduits au sein de l'entreprise Onyx Développement, qui avaient montré qu'une suspension de graines d'arachide broyées en milieu aqueux pouvait former un gel en présence d'une enzyme, la transglutaminase. Afin de comprendre ce processus de structuration, nous avons étudié le rôle des différents composants de l'arachide (protéines, lipides, amidon) dans les propriétés du gel, ainsi que la façon dont ces propriétés pouvaient être modulées par le procédé. Les paramètres opératoires explorés ont été d'une part la force ionique, au travers de son impact sur la solubilité des protéines et sur leur gélification, et d'autre part le procédé de gélification, avec l'application d'un traitement thermique à des suspensions brutes ou prétraitées par la transglutaminase.

Nous avons dans un premier temps confirmé la capacité de cette suspension à former des gels par trois procédés : thermique, acidifiant et enzymatique, et évalué l'impact de ces différents procédés sur les propriétés rhéologiques du gel. A la suite de la caractérisation des propriétés rhéologiques des gels formés par ces trois procédés, nous en avons choisis deux pour la suite de l'étude selon des critères d'intérêts industriels et de complémentarité des procédés: un traitement thermique, et une combinaison d'un prétraitement enzymatique suivi d'un traitement thermique. En effet, le traitement thermique permet de stabiliser la structuration de la matrice (plateau des modules après refroidissement) et les activités d'enzymes endogènes comme exogènes (transglutaminase) par dénaturation, ainsi que de stériliser le produit. Il s'agit donc d'un traitement particulièrement intéressant. Sa combinaison avec un prétraitement enzymatique permet d'obtenir des gels plus élastiques. D'après la bibliographie, on peut également s'attendre à ce que le prétraitement enzymatique apporte une meilleure capacité de rétention d'eau, une propriété importante lorsqu'on souhaite éviter la synérèse de produits alimentaires au cours de la conservation (Lantto, 2007, p. 45).Des gels ont alors été formés dans ces conditions et caractérisés par rhéologie et microscopie confocale.

Parallèlement, nous avons fractionné la suspension à deux forces ioniques différentes (0,5 mol/L et 0,8 mol/L). Les deux forces ioniques utilisées nous permettent de faire un focus sur l'extraction des protéines, en faisant l'hypothèse que des forces ioniques d'extraction différentes permettront d'extraire des protéines de nature différentes. Les travaux de fractionnement ont démontré qu'il était possible de séparer une suspension de graines d'arachide broyée en trois fractions : un surnageant principalement composé de corps lipidiques (~95 g/100 g de matière sèche), une fraction

intermédiaire contenant les éléments solubles (protéines et glucides simples) et un culot qui contient les éléments insolubles (polyoses, protéines insolubles). Lors de ces travaux, la force ionique nous a permis d'obtenir des suspensions avec des taux de solubilisation différents (40 % de protéines solubles à 0,5 mol/L et 59 % à 0,8 mol/L).

Dans l'identification de ces protéines, nous avons observé que différentes forces ioniques d'extraction résultaient en des **ratio conarachine/arachine différents, environ ~6 fois plus important à 0,5 qu'à 0,8 mol/L**. Or, ce ratio a été identifié comme positivement corrélé avec la force des gels formés par agrégation thermique (Wang et al., 2014). Nos résultats ont confirmé cette corrélation, et nous avons pu l'expliquer entre autre par un plus grand nombre de groupement thiols (susceptible de former des ponts disulfures) dans la conarachine que dans l'arachine. Nous avons également pu observer un module élastique plus important à 0,5 mol/L pour les gels obtenus par traitement enzymatique suivi d'un traitement thermique, que nous avons pu relier à de plus grandes concentrations en lysines et glutamines (substrats de la transglutaminase) dans la conarachine que dans l'arachine. Les résultats obtenus sur la mesure du module de conservation de gels de protéines à différentes concentrations en protéines correspondent aux prédictions associées à un modèle fractal. Les **dimensions fractales déterminées**, pour un traitement thermique seul et à l'issue d'un prétraitement enzymatique complété par un traitement thermique, sont respectivement caractéristiques de régimes d'agrégation limités par la diffusion et limités par la réaction. A notre connaissance, une structure fractale de gels de protéines d'arachide n'a à ce jour été établi que sur des gels formés par acidification. La dimension fractale alors estimée était de 2,2 par rhéologie et de 2,3 par analyse d'image de microscopie (Bi et al., 2019). Nous avons également pu observer par microscopie confocale qu'ajouter un prétraitement enzymatique modifiait la microstructure du réseau formé. Le gel présente alors un maillage plus dense que lors d'une gélification par traitement thermique seul, ce qui est cohérent avec les dimensions fractales mesurées. Nous avons également démontré que les sucres solubles n'influençaient pas les propriétés rhéologiques des gels de protéines d'arachide en observant le même module élastique pour des solutions contenant 3,6 g/100 g de sucres solubles et d'autres dont les sucres ont été éliminé par dialyse (à une même concentration en protéine). Etant donné que la concentration en protéines dans la fraction intermédiaire forme des gels faibles par traitement thermique seul et ne permet pas de gélifier le système par traitement enzymatique, cela implique que les autres fractions (surnageant et culot) jouent un rôle important dans la gélification du mix.

Lorsque l'on considère la graine d'arachide dans son intégralité, on obtient également dans la suspension des lipides (50 g/100 g en masse sèche de la suspension) sous forme de sphérosomes recouverts de phospholipides et de protéines, ainsi que des sucres (~22 g/100 g en masse sèche de

suspension dont ~55 g/100 g de glucides totaux sont insolubles). L'ajout de la fraction lipidique a permis d'observer un **effet de renfort** de l'élasticité du gel formé lors d'un traitement thermique. Un effet d'augmentation du module élastique avec la concentration en sphérosomes a pu être observé lors d'un traitement enzymatique suivi d'un traitement thermique et lors d'un traitement thermique seul. Dans le premier cas, les protéines et les glucides solubles de l'arachide ne suffisent pas à former un gel tandis que l'ajout de la fraction lipidique permet cette formation d'un gel (G'=40 Pa) lors du traitement enzymatique. Dans le second cas (traitement thermique seul), la présence des sphérosomes permet de passer d'un gel de module élastique G'=20 Pa à un gel de module élastique G'=40 Pa (figure VII.1). Dans le cas d'un traitement thermique seul, l'évolution du module élastique avec la fraction volumique en sphérosomes **correspond à celle décrite par les modèles de van der Poel et de van Vliet**, ce qui nous apprend que les **gouttelettes lipidiques** de la matrice sont plus **rigides** que le réseau protéique et **interagissent** avec ce dernier (van der Poel, 1958; van Vliet, 1988). Les modules de conservation des gels formés à partir d'un mélange de surnageant et de fraction intermédiaire (40 Pa dans les deux conditions de procédés) ne sont cependant pas représentatifs de ceux formés à partir du mix (290 et 1900 Pa par traitement thermique et succession d'un traitement enzymatique et d'un traitement thermique), ce qui implique que l'effet apporté par le culot est principalement responsable des propriétés élastiques des gels de mix d'arachide.

Si on analyse ensuite les composants insolubles composant le culot, notamment l'amidon gélatinisé et les polyoses solubilisés par le traitement thermique, ainsi que les protéines insolubles, on observe que ces constituants sont responsables pour la plus grande partie des propriétés mécaniques du gel formé à partir de la suspension de graine broyée non fractionnée. En effet, le culot lavé et simplement re-dispersé dans une solution saline, peut induire la gélification du système. Ce résultat suggère un rôle important des polyoses possiblement libérés à chaud, et susceptibles d'interagir par interactions électrostatiques avec les protéines, en complément du renforcement lié à la présence de granules insolubles rigides tels que l'amidon. De plus, les gels formés à partir de suspension de **protéines solubles et de ces composants insolubles présentent des modules élastiques proches de ceux du mix**, de 420 Pa par traitement thermique seul et de 1900 Pa lorsque le traitement thermique est précédé d'un traitement enzymatique par la transglutaminase (figure VII.1).

Il a pu être démontré que cet effet des sphérosomes sur les propriétés élastiques du gel était dû à des interactions entre le réseau de protéines solubles et les protéines en surface des sphérosomes. En ce qui concerne l'effet des polyoses, il peut s'agir 1) d'interactions entre le réseau de protéines solubles et les polyoses susceptibles d'être solubilisés lors du traitement thermique, et 2), d'un effet dû à la rigidité de certains polyoses (par exemple : l'amidon qui est protégé de la gélatinisation par traitement

thermique lors de la formation d'un réseau protéique à froid au cours du prétraitement par la transglutaminase). Ainsi, c'est la concentration de chaque fraction, et le procédé de gélification imposé (par exemple, thermique ou enzymatique puis thermique) qui permet de piloter les propriétés mécaniques d'un gel pour obtenir des propriétés mécaniques spécifiques. On observe en effet en figure VII.1 que pour les deux procédés étudiés ici (traitement thermique avec ou sans prétraitement enzymatique), chaque fraction module de façon significative ($p<0,05$) le module de conservation du G' formé. On observe bien dans chaque condition l'effet de la combinaison des deux procédés. Dans le cas de la fraction intermédiaire, ce prétraitement empêche la formation du gel suite au traitement thermique suivant. L'ajout du surnageant permet l'obtention d'un gel par procédé enzymatique puis thermique, de module élastique proche de celui du gel obtenu dans les mêmes conditions par traitement thermique seul (figure VII.1). Enfin, pour les gels formés à partir de mix ou d'un mélange de fraction intermédiaire et de culot, l'ajout d'un prétraitement enzymatique multiplie par 4,5 fois le module de conservation du gel à l'issu du traitement thermique (~420 Pa sans prétraitement, contre ~1900 Pa avec application d'un prétraitement enzymatique).

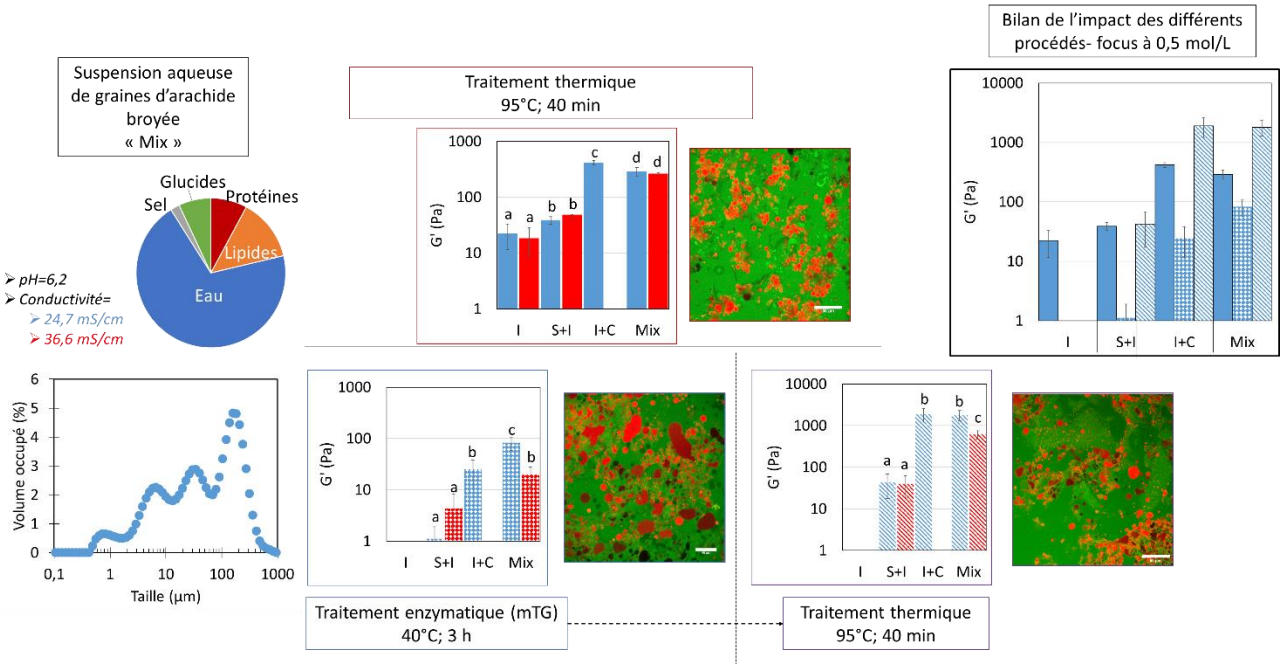


Figure VII.1 : Composition et propriétés d'une suspension de graines d'arachide broyées, et impact du procédé et des différentes fractions du mélange sur ses propriétés structurelles et élastiques. I : Fraction intermédiaire ; S+I : Surnageant +Fraction intermédiaire ; I+C : Fraction intermédiaire +Culot (mesures effectuées à 0,5 mol/L uniquement). Dans les graphiques ; En bleu : échantillons à 0,5 mol/L ; en rouge : échantillons à 0,8 mol/L. Echelle des photos de microscopie : 50 µm

On peut envisager les perspectives de ces travaux à deux niveaux : dans un objectif du développement de connaissances pour la recherche, et dans une vision d'application industrielle.

Dans le cadre d'un développement de produit, les paramètres d'extraction des protéines peuvent être optimisés afin d'obtenir des gels plus élastiques, formés plus rapidement. En effet, la littérature nous apprend que 70 à 90 % des protéines de l'arachide sont solubles, or nous en solubilisons au maximum 60 %, à 0,8 mol/L (Basha and Cherry, 1976; Wang et al., 2017). L'optimisation de la solubilisation des protéines peut se faire par l'optimisation des conditions de broyage, qui n'ont pas été étudiées dans cette recherche, par l'utilisation d'autres conditions salines (utilisations de $CaCl_2$ par exemple) ainsi que par l'ajout de prétraitement tels que des traitements à la pression ou des ultrasons (Wang, 2017, pp. 290–350). De même, les paramètres de gélification mis en place peuvent être optimisés, de façon à obtenir des gels plus élastiques par exemple (temps, température, concentration en enzyme, pH, force ionique).

L'étude de l'ajout d'une phase dispersée constitue la partie la plus complexe de ce travail et celle qui demande le plus de travail de complétion. En effet, nous n'avons pas pu confirmer la tendance d'un renfort plus important des échantillons extraits et gélifiés à 0,8 mol/L par rapport aux échantillons à 0,5 mol/L dans le cadre d'une gélification thermique, ni démontrer les raisons du renfort pour les gels enzymatiques. Deux hypothèses ont été émises suite à cette tendance : 1) les oléosines se lient préférentiellement aux arachines, et 2) les oléosines forment davantage de liaisons en milieu à forte concentration en NaCl). Ces hypothèses pourraient être confirmées/infirmées en faisant des tests de gélification d'isolats de protéines extraits à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L et chacun re-suspendu dans des solutions à ces deux forces ioniques (méthode mise en place dans le chapitre II). Il sera alors possible de mesurer séparément l'effet de la nature des protéines et celui de la force ionique. Dans l'objectif d'un développement de produit, des mesures par spectroscopie dans le proche infrarouge (Near-Infrared Spectroscopy, NIR) permettraient de mesurer l'indice de peroxyde des lipides, et ainsi de suivre leur oxydation au cours du traitement (ISO 3960, 2017). Il s'agit donc d'une méthode qui peut être mis en place pour étudier la stabilité des lipides de l'arachide dans un produit, selon ses conditions de préparation.

Concernant l'étude du culot et de son effet sur la gélification du mix, il serait intéressant d'identifier et de quantifier les polyoses qui le composent par chromatographie en phase liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) couplée à un détecteur à indice de réfraction (Basha, 1992; Southgate, 1969) ou par colorimétrie (Dubois et al., 1956). Leur identification permettrait par la suite de développer une méthode de séparation de ces composants. Une fois fractionnés, il sera alors possible de mesurer séparément les impacts de l'amidon des fibres et des hétéropolyoses de l'arachide (Liu et al., 2016). Cela permettrait notamment de définir quels types de structures est formé par chacun de ces composants, dans quelles conditions de ratio

protéines:polyoses, et ainsi de disposer d'un nouveau levier susceptible de piloter les propriétés de gels de suspension d'arachide.

Concernant les procédés, la compréhension de l'impact et de l'efficacité du traitement enzymatique peut être approfondie. On pourrait pour cela effectuer des mesures d'électrophorèses des protéines avant et après traitement enzymatique pour identifier quelles protéines vont s'agréger préférentiellement, et estimer la proportion de chaque protéine ayant réagi. L'étude du réseau gélifié par microscopie électronique à balayage permettrait d'observer avec plus de précision le réseau plus dense observe par microscopie confocale. Il serait alors possible de quantifier cet effet par mesure de tailles de pores, par exemple.

De plus, l'étude bibliographique effectuée dans le cadre de ces travaux a permis de mettre en évidence d'autres procédés qui n'ont pas pu être étudiés au cours de cette thèse et dont l'impact sur l'extraction des protéines ou sur leur structuration est avéré, tels que le type de broyage de la graine utilisé, les conditions de blanchiment de la graine, l'usage des ultrasons, de la pression ou l'extraction des protéines par le pH ou par ultrafiltration (Assatory et al., 2019; Byanju et al., 2020; Liu et al., 2019; Ma et al., 2017).

La force ionique semble influencer fortement les propriétés du gel formé à partir de la suspension entière d'arachide (mix) dans nos conditions. En effet, le module de conservation obtenu est 3 fois plus important à 0,5 qu'à 0,8 mol/L lors de l'application d'un prétraitement enzymatique. En termes industriels, la concentration et la nature du sel utilisée pour solubiliser les protéines a également un impact sur la conservation des produits ainsi que sur le goût de l'aliment. Il s'agit donc de paramètres qui pourraient être étudiées en parallèle de celui du taux d'extraction des protéines pour l'optimisation des propriétés organoleptiques (notamment de goût et de texture) d'un produit à base de suspension d'arachide.

De plus, pour un développement raisonné de nouveaux aliments, ce travail sur la biophysique de la matrice devra être complété par des essais complémentaires de formulation, des tests sensoriels et éventuellement des tests consommateurs afin de garantir un produit bon, sain, et adapté aux habitudes alimentaires des populations locales. L'étude de l'impact des procédés utilisés sur l'allergénicité et la digestibilité des protéines d'arachide est également un travail essentiel à mener afin d'apporter un regard complémentaire à ces résultats.

La méthode mise en place au cours de cette thèse et son évolution suggérée ci-dessus peuvent également être adaptées pour la valorisation d'autres légumineuses méconnues telles que le niébé (*Vigna unguiculata* subso. *Unguiculata*) et le pois bambara (*Voundzeira subterranea*) riches en

protéines et pauvres en lipides, et les différentes fèves et lentilles riches en fibres et micro-nutriments (Javaloyes, 2016). On peut imaginer des formulations à base de plusieurs légumineuses, si l'on démontre par exemple qu'une légumineuse possède une globuline semblable à la conarachine en grande quantité. On peut alors moduler les propriétés rhéologiques dans une large gamme de texture en formulant des produits à base de cette légumineuse (dans les bonnes conditions de solubilisation de la-dite globuline) et d'une autre source végétale riche en polyose (légumineuse ou céréale) à différentes fractions volumiques. Dans le contexte de pays dans lesquels l'offre de produits sains est aujourd'hui limitée, cette démarche permet d'apporter une nouvelle offre contribuant à la fois au développement économique des pays producteurs et à la qualité de l'alimentation de leurs populations en état d'insécurité alimentaire.

Valorisations scientifiques

Publication dans des revues internationales à comité de lecture

Basse, B., Bosc, V., Saiter, J., Chan-Huot, M., Dupas, J., Maillard, M.-N., & Menut, P. (2020). **Combined effects of ionic strength and enzymatic pre-treatment in thermal gelation of peanut proteins extracts**. *Food Research International*, *137* (May). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109362

(Publié)

Communications lors de congrès internationaux

Basse, B., Bosc, V., Maillard, M.-N., Lorand, J.-P., Dupas, J.-P., Saiter, J.-M., & Menut, P. (2018). **Peanut suspension gelation capacity assessment**. *Kathmandu Symposium on Advanced Materials*.

(Oral)

Références

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2007. Apport en protéines: consommation, qualité, besoins et recommandations

Ai, Y., Jane, J.L., 2015. Gelatinization and rheological properties of starch. Starch/Staerke 67, 213–224. https://doi.org/10.1002/star.201400201

Alting, A.C., Hamer, R.J., De Kruif, C.G., Visschers, R.W., 2003. Cold-Set Globular Protein Gels : Interactions , Structure and Rheology as a Function of Protein Concentration. J. Agric. Food Chem. 51, 3150–3156

Alting, A.C., Weijers, M., de Hoog, E.H.A., van de Pijpekamp, A.M., Cohen Stuart, M.A., Hamer, R.J., de Kruif, C.G., Visschers, R.W., 2004. Acid-Induced Cold Gelation of Globular Proteins: Effects of Protein Aggregate Characteristics and Disulfide Bonding on Rheological Properties. J. Agric. Food Chem. 52, 623–631. https://doi.org/10.1021/jf034753r

Amonsou, E., Taylor, J., Minnaar, A., 2011. Microstructure of protein bodies in marama bean species. LWT - Food Sci. Technol. 44, 42–47. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.021

Andersen, P.C., Hill, K., Gorbet, D.W., Brodbeck, B. V., 1998. Fatty Acid and Amino Acid Profiles of Selected Peanut Cultivars and Breeding Lines. J. Food Compos. Anal. 11, 100–111

Angelo, A.J.S.T., Kuck, J.C., Hensarling, T.P., Ory, R.L., 1977. Effects of Water and Spin Blanching on Oxidative Stability of Peanuts. J. Food Process. Preserv. 1, 249–260. https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1977.tb00327.x

Angelo, A.J.S.T., Mann, G.E., 1973. Peanut Proteins, in: Peanut: Culture and Uses. American Peanut Research and Education Society, pp. 559–592

ANSES, 2017. Table de composition nutritionnelle des aliments Ciqual 2017 [WWW Document]. URL https://ciqual.anses.fr/

ANSES, 2016. Actualisation des repères du PNNS : élaboration des références nutritionnelles. Maisons-Alfort

Arnold, D., 2014. Cooking Issues. Cours de l'Université de Harvard

Arrêté du 3 décembre 1993, 1993. . Journal Officiel de la République Française, France

Arya, S.S., Salve, A.R., Chauhan, S., 2016. Peanuts as functional food: a review. J. Food Sci. Technol. 53, 31–41. https://doi.org/10.1007/s13197-015-2007-9

Asibuo, J.Y., Akromah, R., Safo-Kantanka, O., Adu-Dapaah, H.K., Ohemeng-Dapaah, S., Agyeman, A., 2008. Chemical composition of groundnut, Arachis hypogaea (L) landraces. African J. Biotechnol. 7, 2203–2208. https://doi.org/10.5897/AJB08.113

Assatory, A., Vitelli, M., Rajabzadeh, A.R., Legge, R.L., 2019. Dry fractionation methods for plant protein, starch and fiber enrichment: A review. Trends Food Sci. Technol. 86, 340–351. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.006

Bagheri, H., Kashaninejad, M., Ziaiifar, A.M., Aalami, M., 2019. Textural, color and sensory attributes of peanut kernels as affected by infrared roasting method. Inf. Process. Agric. 6, 255–264. https://doi.org/10.1016/j.inpa.2018.11.001

Bao, Y., 2014. Association of nut consumption with total and cause-specific mortality. Indian Heart J. 66, 388–389. https://doi.org/10.1016/j.ihj.2014.03.020

Barrett, A.H., Peleg, M., 1995. Applications of fractal analysis to food structure. LWT - Food Sci. Technol. 28, 553–563. https://doi.org/10.1016/0023-6438(95)90001-2

Basha, S.M., 1992. Soluble sugar composition of peanut seed. J. Agric. Food Chem. 40, 780–783. https://doi.org/10.1021/jf00017a015

Basha, S.M., Cherry, J.P., 1976. Composition, Solubility, and Gel Electrophoretic Properties of Proteins Isolated from Florunner. J. Agric. Food Chem. 24, 359–365

Basse, B., D'Huart, J.-B., Lorand, J.-P., Dupas, J.-P., Saiter, J.-M., 2018. Peanut Suspension Crosslinking by Means of Microbial Transglutaminase Studied with the Indentation Technique. Macromol. Symp. 382, 1800067. https://doi.org/10.1002/masy.201800067

Batista, A.P., Portugal, C.A.M., Sousa, I., Crespo, J.G., Raymundo, A., 2005. Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques. Int. J. Biol. Macromol. 135–143. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.04.003

Ben-Harb, S., Panouillé, M., Huc-Mathis, D., Moulin, G., Saint-Eve, A., Irlinger, F., Bonnarme, P., Michon, C., Souchon, I., 2018. The rheological and microstructural properties of pea, milk, mixed pea/milk gels and gelled emulsions designed by thermal, acid, and enzyme treatments. Food Hydrocoll. 77, 75–84. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.022

Beninati, S., Piacentini, M., 2004. The transglutaminase family: an overview: Minireview article. Amino Acids 26, 367–372. https://doi.org/10.1007/s00726-004-0091-7

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Chemical Bonds in Biochemistry, in: Biochemistry. New York, pp. 1–7

Berghout, J.A.M., Boom, R.M., van der Goot, A.J., 2015. Understanding the differences in gelling properties between lupin protein isolate and soy protein isolate. Food Hydrocoll. 43, 465–472. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.003

Bernal, J.D., Finney, J.L., 1967. Geometry of Random Packing of Hard Spheres. Discuss. Faraday Soc. 43, 62–69. https://doi.org/10.1039/DF9674300062

Bethke, P.C., Hillmer, S., Jones, R.L., 1996. Isolation of Intact Protein Storage Vacuoles from Barley Aleurone. Plant Physiol. 110, 521–529

Beverung, C.J., Radke, C.J., Blanch, H.W., 1999. Protein adsorption at the oil/water interface: Characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. Biophys. Chem. 81, 59–80. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00082-4

Beyer, K., Morrow, E., Li, X.M., Bardina, L., Bannon, G.A., Burks, A.W., Sampson, H.A., 2001. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. J. Allergy Clin. Immunol. 107, 1077–1081. https://doi.org/10.1067/mai.2001.115480

Bhushan, R., Agarwal, R., 2008. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic, gel electrophoretic and size exclusion chromatographic studies of subunit structure of arachin and its molecular species. Biomed. Chromatogr. 288, 278–288. https://doi.org/10.1002/bmc

Bi, C. hao, Zhang, M., Sun, D. yu, Hua, Z., Zhu, Y. dan, Liu, Y. de, Huang, Z. gang, Gao, F., 2019. A novel critical point for isotropic gel in rheological-fractal model. J. Food Eng. 244, 40–46. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.023

Bilello, S., 2016. 21st Century Homestead: Nitrogen-Fixing Crops. Lulu.com, Morrisville

Blijdenstein, T.B.J., Hendriks, W.P.G., van der Linden, E., van Vliet, T., van Aken, G.A., 2003. Control of strength and stability of emulsion gels by a combination of long- and short-range interactions. Langmuir 19, 6657–6663. https://doi.org/10.1021/la0342969

Boire, A., Renard, D., Bouchoux, A., Pezennec, S., Croguennec, T., Lechevalier, V., LecFloch-fouéré, C., Bouhallab, S., Menut, P., 2019. Soft-Matter Approaches for Controlling Food Protein Interactions and Assembly. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 10, 521–539

Boye, J.I., Zare, F., Pletch, A., 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. Food Res. Int. 43, 414–431. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003

Brown, D.F., Cater, C.M., Mattil, K.F., Darroch, J.G., 1975. Effect of variety, growing location and their interaction on the fatty acid composition of peanuts. J. Food Sci. 40, 1055–1060

Brown, W.L., 1942. The Threonine, Serine, Cystine And Methionine Content of Peanut Proteins. J. Biol. Chem. 142, 299–302

Bublin, M., Breiteneder, H., 2014. Cross-reactivity of peanut allergens. Curr. Allergy Asthma Rep. https://doi.org/10.1007/s11882-014-0426-8

Byanju, B., Rahman, M., Hojilla-evangelista, M.P., Lamsal, B.P., 2020. Effect of high-power sonication pretreatment on extraction and some physicochemical properties of proteins from chickpea , kidney bean , and soybean. Int. J. Biol. Macromol. 145, 712–721. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.118

Cabanos, C., Urabe, H., Tandang-Silvas, M.R., Utsumi, S., Mikami, B., Maruyama, N., 2011. Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1. Mol. Immunol. 49, 115–123. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.08.004

Çakir, E., Khan, S.A., Foegeding, E.A., 2012. The effect of pH on gel structures produced using protein-polysaccharide phase separation and network inversion. Int. Dairy J. 27, 99–102. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.03.013

Carrín, M.E., Carelli, A.A., 2010. Peanut oil: Compositional data. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 112, 697–707. https://doi.org/10.1002/ejlt.200900176

Casimir, H.B.G., Polder, D., 1948. The influence of retardation on the London-van der Waals forces. Phys. Rev. 73, 360–372. https://doi.org/10.1103/PhysRev.73.360

Chen, C., Huang, X., Wang, L. jun, Li, D., Adhikari, B., 2016. Effect of flaxseed gum on the rheological properties of peanut protein isolate dispersions and gels. LWT - Food Sci. Technol. 74, 528–533. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.013

Chen, T., Embree, H.D., Brown, E.M., Taylor, M.M., Payne, G.F., 2003. Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: Potential for in situ applications. Biomaterials 24, 2831–2841. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00096-6

Chéreau, D., Videcoq, P., Ruffieux, C., Pichon, L., Motte, J.C., Belaid, S., Ventureira, J., Lopez, M., 2016. Combination of existing and alternative technologies to promote oilseeds and pulses proteins in food applications. Oilseeds fats, Crop. Lipids 23

Chetschik, I., Granvogl, M., Schieberle, P., 2010. Quantitation of key peanut aroma compounds in raw peanuts and pan-roasted peanut meal. aroma reconstitution and comparison with commercial peanut products. J. Agric. Food Chem. 58, 11018–11026. https://doi.org/10.1021/jf1026636

Chevalier, A., 1934. Monographie de l ' Arachide (Suite). Rev. Bot. appliquée d'agriculture Colon. 14, 565–632. https://doi.org/10.3406/jatba.1934.5400

Chevalier, A., 1933. Monographie de l ' Arachide. Rev. Bot. appliquée d'agriculture Colon. 13, 689–789. https://doi.org/10.3406/jatba.1933.5292

Chihi, M.L., Mession, J.-L., Sok, N., Saurel, R., 2016. Heat-Induced Soluble Protein Aggregates from Mixed Pea Globulins and β-Lactoglobulin. J. Agric. Food Chem. 64, 2780–2791. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00087

Chiou, R.Y., 1990. Effects of Heat Treatment on Peanut Arachin and Conarachin. J. Food Biochem. 14, 219–232. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1990.tb00835.x

Chronakis, I.S., Kasapis, S., 1993. Structural properties of single and mixed milk / soya protein systems. Food Hydrocoll. 7, 459–478

Chun, J.-Y., 2002. Vitamin E content and stability in peanuts and peanut products during processing and storage. University of Georgia

Chung, K.H., Shin, K.O., Hwang, H.J., Choi, K.S., 2013. Chemical composition of nuts and seeds sold in Korea. Nutr. Res. Pract. 7, 82–88. https://doi.org/10.4162/nrp.2013.7.2.82

Clare, D.A., Gharst, G., Sanders, T.H., 2007. Transglutaminase polymerization of peanut proteins. J. Agric. Food Chem. 55, 432–438. https://doi.org/10.1021/jf062309t

Clark, A.H., Kavanagh, G.M., Ross-Murphy, S.B., 2001. Globular protein gelation- Theory and experiment. Food Hydrocoll. 15, 383–400. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00042-X

Colombo, A.S., Daniel Ribotta, P., Edel Leo, A.N., 2010. Differential Scanning Calorimetry (DSC) Studies on the Thermal Properties of Peanut Proteins. J. Agric. Food Chem. 58, 4434–4439. https://doi.org/10.1021/jf903426f

CRB, 2007. The CRB Commodity Yearbook. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken

Creighton, T.E., 1993. Proteins: structures and molecular properties. Freeman W.H, New York

Croguennoc, P., Nicolai, T., Durand, D., Clark, A., 2001. Phase separation and association of globular protein aggregates in the presence of polysaccharides: 2. Heated mixtures of native β-lactoglobulin and κ-carrageenan. Langmuir 17, 4380–4385. https://doi.org/10.1021/la001675i

Darko, C., Kumar Mallikarjunan, P., Kaya-Celiker, H., Frimpong, E.A., Dizisi, K., 2018. Effects of packaging and pre-storage treatments on aflatoxin production in peanut storage under controlled conditions. J. Food Sci. Technol. 55, 1366–1375. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3051-z

Daussant, J., Neucere, N.J., Yatsu, L.Y., 1969. Immunochemical Studies on Arachis hypogaea Proteins With Particular Reference to the Reserve Proteins. I. Characterization, Distribution and Properties of alpha-Arachin and alpha-Conarachin. Plant Physiol. 44, 471–479

Davaatseren, M., Hong, G.P., 2014. Effect of NaCl , Gum Arabic and Microbial Transglutaminase on the Gel and Emulsion Characteristics of Porcine Myofibrillar Proteins. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 34, 808–814

Davis, J.P., Gharst, G., Sanders, T.H., 2007. Some rheological properties of aqueous peanut flour dispersions. J. Texture Stud. 38, 253–272. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2007.00097.x

Davis, J.P., Sweigart, D.S., Price, K.M., Dean, L.L., Sanders, T.H., 2013. Refractive index and density measurements of peanut oil for determining oleic and linoleic acid contents. J. Am. Oil Chem. Soc. 90, 199–206. https://doi.org/10.1007/s11746-012-2153-4

de Camargo, A.C., Regitano-d'Arce, M.A.B., de Alencar, S.M., Canniatti-Brazaca, S.G., de Souza Vieira, T.M.F., Shahidi, F., 2016. Chemical Changes and Oxidative Stability of Peanuts as Affected by the Dry-Blanching. J. Am. Oil Chem. Soc. 93, 1101–1109. https://doi.org/10.1007/s11746-016-2838-1

Dickinson, E., 2014. Understanding Food Structures: The Colloid Science Approach, Food Structures, Digestion and Health. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404610-8.00001-3

Dickinson, E., 2012. Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. Food Hydrocoll. 28, 224–241. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.017

Dickinson, E., 2008. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. Soft Matter 4, 932–942. https://doi.org/10.1039/b800106e

Dickinson, E., 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocoll. 17, 25–39. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00120-5

Dickinson, E., 1997. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. Trends Food Sci. Technol. 8, 334–339

Dieckert, J.W., Snowden, J.E., Moore, A.T., Heinzlman, D.C., Altschul, A.M., 1962. Composition of Some Subcellular Fractions from Seeds of Arachis hypogaea. J. Food Sci. 27, 321–325. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1962.tb00100.x

Dougherty, R.C., 2001. Density of salt solutions: Effect of ions on the apparent density of water. J. Phys. Chem. B 105, 4514–4519. https://doi.org/10.1021/jp010097r

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28, 350–356. https://doi.org/10.1021/ac60111a017

Dzyaloshinskii, I.E., Lifshitz, E.M., Pitaevskii, L.P., 1992. The general theory of van der Waals forces, in: Perspectives in Theoretical Physics. Pergamon Press plc, pp. 443–492. https://doi.org/10.1016/b978-0-08-036364-6.50039-9

Eilers, H., 1941. Die Viskosität von Emulsionen hochviskoser Stoffe als Funktion der Konzentration. Kolloid-Zeitschrift 97, 313–321. https://doi.org/10.1007/BF01503023

Eissa, A.S., Khan, S.A., 2005. Acid-induced gelation of enzymatically modified, preheated whey proteins. J. Agric. Food Chem. 53, 5010–5017. https://doi.org/10.1021/jf047957w

Ejigui, J., Savoie, L., Marin, J., Desrosiers, T., 2005. Influence of Traditional Processing Methods on the Nutritional Composition and Antinutritional Factors of Red Peanuts (Arachis hypogea) and Small Red Kidney Beans (Phaseolus vulgaris). J. Biol. Sci. 5, 597–605. https://doi.org/10.3923/jbs.2005.597.605

Elbers, N.A., van der Hoeven, J.E.S., Matthijs de Winter, D.A., Schneijdenberg, C.T.W.M., van der Linden, M.N., Filion, L., van Blaaderen, A., 2016. Repulsive van der Waals forces enable Pickering emulsions with non-touching colloids. Soft Matter 12, 7265–7272. https://doi.org/10.1039/C6SM01294A

Eleya, M.M.O., Turgeon, S.L., 2000. Rheology of k -carrageenan and b -lactogloEleya, M. M. O., & Turgeon, S. L. (2000). Rheology of k -carrageenan and b -lactoglobulin mixed gels. Food Hydrocolloids, 14, 29–40.bulin mixed gels. Food Hydrocoll. 14, 29–40

Evans, W.J., Carney, W.B., Dechary, J.M., Altschul, A.M., 1962. Zone electrophoresis of conarachin, a-conarachin and bovine serum albumin on polyacrylamide gel. Arch. Biochem. Biophys. 96, 233–239

FAO, 2017. FAOSTAT. URL http://www.fao.org/faostat/en/ (accessed 1.30.20)

Feldman, E.B., 1999. Assorted monounsaturated fatty acids promote healthy hearts. Am. J. Clin. Nutr. 70, 953–954

Feng, X., Liu, H., Shi, A., Liu, L., Wang, Q., Adhikari, B., 2014. Effects of transglutaminase catalyzed crosslinking on physicochemical characteristics of arachin and conarachin-rich peanut protein fractions. Food Res. Int. 62, 84–90. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.022

Ferry, J.D., 1948. Protein Gels, in: Anson, M.L., Edsall, J.T. (Eds.), Advances in Protein Chemistry. Academic Press, Inc., New York, pp. 1–78

Fischer, H., Polikarpov, I., Craievich, A.F., 2009. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. Protein Sci. 13, 2825–2828. https://doi.org/10.1110/ps.04688204

Foegeding, E.A., 2015. Food Protein Functionality--A New Model. J. Food Sci. 80, C2670–C2677. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13116

Francisco, M.L.D.L., Resurreccion, A.V.A., 2008. Functional components in peanuts. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 48, 715–746. https://doi.org/10.1080/10408390701640718

Fraser, G.E., Sabate, J., Beeson, W.L., Strahan, T.M., 1992. A Possible Protective Effect of Nut Consumption on Risk of Coronary Heart Disease: The Adventist Health Study. Arch. Intern. Med. 152, 1416–1424. https://doi.org/10.1001/archinte.1992.00400190054010

Frey-Wyssling, A., Grieshaber, E., Mühlethaler, K., 1963. Origin of spherosomes in plant cells. J. Ultrasructure Res. 8, 506–516. https://doi.org/10.1016/S0022-5320(63)80052-0

Fuhrmann, P.L., Sala, G., Stieger, M., Scholten, E., 2020. Effect of oil droplet inhomogeneity at different length scales on mechanical and sensory properties of emulsion-filled gels: Length scale matters. Food Hydrocoll. 101, 105462. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105462

Gan, C.Y., Latiff, A.A., Cheng, L.H., Easa, A.M., 2009. Gelling of microbial transglutaminase cross-linked soy protein in the presence of ribose and sucrose. Food Res. Int. 42, 1373–1380. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.001

Gauche, C., Vieira, J.T.C., Ogliari, P.J., Bordignon-Luiz, M.T., 2008. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. Process Biochem. 43, 788–794. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.004

Genccelep, H., Saricaoglu, F.T., Anil, M., Agar, B., Turhan, S., 2015. The effect of starch modification and concentration on steady-state and dynamic rheology of meat emulsions. Food Hydrocoll. 48, 135–148. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.002

Gharst, G., 2007. Biochemical and Rheological Characterization of Peanut Proteins Crosslinked with Microbial Transglutaminase. North Carolina State University

Gharst, G., Clare, D.A., Davis, J.P., Sanders, T.H., 2007. The effect of transglutaminase crosslinking on the rheological characteristics of heated peanut flour dispersions. J. Food Sci. 72, 369–375. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00442.x

Ghatak, S.K., Sen, K., 2013. Peanut proteins: Applications, ailments and possible remediation. J. Ind. Eng. Chem. 19, 369–374. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.09.009

Ghosh, A.K., Bandyopadhyay, P., 2012. Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids, in: Karunaratne, V. (Ed.), The Complex World of Polysaccharides. InTech, pp. 395–408. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/50561

Griel, A.E., Eissenstat, B., Kris-Etherton, P.M., Hsieh, G., Juturu, V., 2004. Improved Diet Quality with Peanut Consumption. J. Am. Coll. Nutr. 23, 660–668. https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719408

Grosso, C.R.F., Rao, M.A., 1998. Dynamic rheology of structure development in low-methoxyl pectin+ Ca2+ +sugar gels. Food Hydrocoll. 12, 357–363. https://doi.org/10.1016/s0268-005x(98)00034-4

Guo, Y., Hu, H., Wang, Q., Liu, H., 2018. A novel process for peanut tofu gel: Its texture, microstructure and protein behavioral changes affected by processing conditions. LWT - Food Sci. Technol. 96, 140–146. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.020

Hagiwara, T., Kumagai, H., Matsunaga, T., Nakamura, K., 1997. Analysis of aggregate structure in food protein gels with the concept of fractal. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 1663–1667. https://doi.org/10.1271/bbb.61.1663

Hao, L., Chen, F., Xia, Y., Zhang, L., Xin, Y., 2016. Size and Charge Stability of Oil Bodies from Peanut. J. Chem. 16–18

Hathorn, C.S., Sanders, T.H., 2012. Flavor and Antioxidant Capacity of Peanut Paste and Peanut Butter Supplemented with Peanut Skins. J. Food Sci. 77, 407–411. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02953.x

Heck, T., Faccio, G., Richter, M., Thöny-Meyer, L., 2013. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 461–475. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4569-z

Héron, R., 2017. Les mangeurs urbains burkinabè, entre satisfaction et sécurisation alimentaires. Université Paris 1 - Panthéon Sorbonne

Higgs, J., 2003. The beneficial role of peanuts in the diet – Part 2. Nutr. Food Sci. 33, 56–64. https://doi.org/10.1108/00346650310466637

Hofmeister, F., 1888. Zur Lehre von der Wirkung der Salze - Dritte Mittheilung. Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie 25, 1–30. https://doi.org/10.1007/BF01838161

Hoover, M.W., 1979. A Rotary Air Impact Peanut Blancher. Peanut Sci. 6, 84–87. https://doi.org/10.3146/i0095-3679-6-2-5

Hovis, A.R., Young, C.T., Tai, P.Y.P., 1982. Variation in Total Amino Acid Percentage in Different Portions of Peanut Cotyledons ’. Peanut Sci. 9, 44–46

Hu, X., Zhao, M., Sun, W., Zhao, G., Ren, J., 2011. Effects of microfluidization treatment and transglutaminase cross-linking on physicochemical, functional, and conformational properties of peanut protein isolate. J. Agric. Food Chem. 59, 8866–8894. https://doi.org/10.1021/jf201781z

Huang, A.H.C., 1996. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. Plant Physiol. 110, 1055–1061. https://doi.org/10.1104/pp.110.4.1055

Ikeda, S., Foegeding, E.A., Hagiwara, T., 1999. Rheological Study on the Fractal Nature of the Protein Gel. Langmuir 15, 8584–8589

Ikeda, S., Zhong, Q., 2012. Polymer and Colloidal Models Describing Structure-Function Relationships. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 3, 405–424. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101250

Ionescu, A., Zara, M., Aprodu, I., Vasile, A., Gurău, G., 2008. Rheology of Gels Containing Pea Protein Isolate Enzymatically Modified With Bacterial Transglutaminase. Sci. Study Res. 9, 345–356

ISO 3960, 2017. Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de l'indice de peroxyde — Détermination avec point d'arrêt iodométrique

ISO 4833-1, 2013. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes — Partie 1 : Comptage des coloniesà 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur

Israelachvili, J.N., 2011. Special Interactions: Hydrogen-Bonding and Hydrophobic and Hydrophilic Interactions, in: Israelachvili, J.N. (Ed.), Intermolecular and Surface Forces. Academic Press, Inc., pp. 151–167. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-375182-9.10008-9

Iwanaga, D., Gray, D.A., Fisk, I.D., Decker, E.A., Weiss, J., McClements, D.J., 2007. Extraction and characterization of oil bodies from soy beans: A natural source of pre-emulsified soybean oil. J. Agric. Food Chem. 55, 8711–8716. https://doi.org/10.1021/jf071008w

Jacks, T.J., Yatsu, L.Y., Altschul, A.M., 1967. Isolation and characterization of peanut spherosomes. Plant Physiol. 42, 585–597. https://doi.org/10.1104/pp.42.4.585

Javaloyes, P., 2016. Légumineuses, des graines nutritives pour un avenir durable

Jiao, B., Shi, A., Liu, H., Sheng, X., Liu, L., Hu, H., Adhikari, B., Wang, Q., 2018a. Effect of electrostatically charged and neutral polysaccharides on the rheological characteristics of peanut protein isolate after high-pressure homogenization. Food Hydrocoll. 77, 329–335. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.009

Jiao, B., Shi, A., Wang, Q., Binks, B.P., 2018b. High-Internal-Phase Pickering Emulsions Stabilized Solely by Peanut-Protein-Isolate Microgel Particles with Multiple Potential Applications. Angew. Chemie - Int. Ed. 57, 9274–9278. https://doi.org/10.1002/anie.201801350

Jin, T., Guo, F., Chen, Y. wei, Howard, A., Zhang, Y.Z., 2009. Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut. Mol. Immunol. 46, 1796–1804. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.01.023

Johns, C.O., Jones, D.B., 1917. The proteins of the peanut. J. Biol. Chem. 30, 33–39

Kain, R.J., Chen, Z., 2010. Physico-functional properties of peanut meal flour as affected by processing methods. J. Food Biochem. 34, 229–243. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00252.x

Kain, R.J., Chen, Z., Sonda, T.S., Abu-Kpawoh, J.C., 2009. Study on the Effect of Control Variables on the Extraction of Peanut Protein Isolates from Peanut Meal (Arachis hypogaea L.). Am. J. Food Technol. 4, 47–55

Karak, N., 2012. Fundamentals of Polymers, in: Vegetable Oil-Based Polymers: Properties, Processing and Applications. Woodhead Publishing Limited, pp. 1–30. https://doi.org/10.1533/9780857097149.1

Karefyllakis, D., Jan Van Der Goot, A., Nikiforidis, C. V., 2019. The behaviour of sunflower oleosomes at the interfaces. Soft Matter 15, 4639–4646. https://doi.org/10.1039/c9sm00352e

Karimi, M., Ignasiak, M.T., Chan, B., Croft, A.K., Radom, L., Schiesser, C.H., Pattison, D.I., Davies, M.J., 2016. Reactivity of disulfide bonds is markedly affected by structure and environment: Implications for protein modification and stability. Sci. Rep. 6, 1–12. https://doi.org/10.1038/srep38572

Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H., Suzuki, E., 2002. Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from Streptoverticillium mobaraense. J. Biol. Chem. 277, 44252–44260. https://doi.org/10.1074/jbc.M203933200

Kaysi, Y., Melcion, J., 1992. Traitements technologiques des protéagineux pour le monogastrique : exemples d'application à la graine de fêverole. Prod. Anim. 1 (5), 3-17. 5

Kella, N.K.D., 1989. Heat-induced reversible gelation of arachin: kinetics, thermodynamics and protein species involved in the process. Int. J. Biol. Macromol. 11, 105–112. https://doi.org/10.1016/0141-8130(89)90051-2

Kelly, J.H., Sabaté, J., 2006. Nuts and coronary heart disease: An epidemiological perspective. Br. J. Nutr. 96. https://doi.org/10.1017/BJN20061865

Kim, K.-H., Renkema, J.M.S., van Vliet, T., 2001. Rheological properties of soybean protein isolate gels containing emulsion droplets. Food Hydrocoll. 15, 295–302. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00028-5

Kirimlidou, M., Matsakidou, A., Scholten, E., Nikiforidis, C. V., Kiosseoglou, V., 2017. Composite gels structured by a gelatin protein matrix filled with oil bodies. Food Struct. 14, 46–51. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.06.003

Klost, M., Drusch, S., 2019. Structure formation and rheological properties of pea protein-based gels. Food Hydrocoll. 94, 622–630. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.030

Klupšaitė, D., Juodeikienė, G., 2015. Legume: composition, protein extraction and functional properties. A review. Chem. Technol. 66, 5–12. https://doi.org/10.5755/j01.ct.66.1.12355

Koppelman, S.J., Knol, E.F., Vlooswijk, R.A.A., Wensing, M., Knulst, A.C., Hefle, S.L., Gruppen, H., Piersma, S., 2003. Peanut allergen Ara h 3: Isolation from peanuts and biochemical characterization. Allergy 58, 1144–1151. https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00259.x

Koppelman, S.J., Vlooswijk, R.A.A., Knippels, L.M.J., Hessing, M., Knol, E.F., van Reijsen, F.C., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., 2001. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. Allergy 56, 132–137. https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.056002132.x

Koseki, T., Kitabatake, N., Doi, E., 1989. Irreversible thermal denaturation and formation of linear aggregates of ovalbumin. Food Hydrocoll. 3, 123–134. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(89)80022-0

Kottapalli, K.R., Payton, P., Rakwal, R., Agrawal, G.K., Shibato, J., Burow, M., Puppala, N., 2008. Proteomics analysis of mature seed of four peanut cultivars using two-dimensional gel electrophoresis reveals distinct differential expression of storage, anti-nutritional, and allergenic proteins. Plant Sci. 175, 321–329. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.005

Kütemeyer, C., Froeck, M., Werlein, H.D., Watkinson, B.M., 2005. The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. Food Control 16, 735–737. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.06.012

Lad, M.D., Birembaut, F., Matthew, J.M., Frazier, R.A., Green, R.J., 2006. The adsorbed conformation of globular proteins at the air/water interface. Phys. Chem. Chem. Phys. 8, 2179–2186. https://doi.org/10.1039/b515934b

Lam, A.C.Y., Karaca, A.C., Tyler, R.T., Nickerson, M.T., 2018. Pea protein isolates : Structure , extraction , and functionality. Food Rev. Int. 34, 126–147. https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135

Lam, R.S.H., Nickerson, M.T., 2013. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. Food Chem. 141, 975–984. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038

Laneuville, S.I., Turgeon, S.L., 2008. Gélification de protéines natives par interaction avec des polysaccharides anioniques

Laneuville, S.I., Turgeon, S.L., Sanchez, C., Paquin, P., 2006. Gelation of native β-lactoglobulin induced by electrostatic attractive interaction with xanthan gum. Langmuir 22, 7351–7357. https://doi.org/10.1021/la060149+

Lantto, R., 2007. Protein cross-linking with oxidative enzymes and transglutaminase: Effects in meat protein systems. VTT Publications. https://doi.org/978-951-38-7023-2

Lavoisier, A., Aguilera, J.M., 2019. Starch gelatinization inside a whey protein gel formed by cold gelation. J. Food Eng. 256, 18–27. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.03.013

Le, X.T., Rioux, L.E., Turgeon, S.L., 2017. Formation and functional properties of protein–polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels. Adv. Colloid Interface Sci. 239, 127–135. https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.04.006

Lefèvre, T., Subirade, M., 2000. Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate β-lactoglobulin gels. Biopolymers 54, 578–586. https://doi.org/10.1002/1097-0282(200012)54:7<578::AID-BIP100>3.0.CO;2-2

Lewis, G.N., Randall, M., 1962. Thermodynamics. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York

Li, H., Yang, C., Chen, C., Rhen, F., Li, Y., Mu, Z., Wang, P., 2018. The Use of Trisodium Citrate to Improve the Textural Properties of Acid-Induced, Transglutaminase-Treated Micellar Casein Gels. Molecules 23, 1–12. https://doi.org/10.3390/molecules23071632

Li, Y., Jin, H., Sun, X., Sun, J., Liu, Chang, Liu, Chunhong, Xu, J., 2019. Physicochemical properties and storage stability of food protein-stabilized nanoemulsions. Nanomaterials 9. https://doi.org/10.3390/nano9010025

Lin, M.Y., Lindsay, H.M., Weitz, D.A., Ball, R.C., Klein, R., Meakin, P., 1990. Universal reaction-limited colloid aggregation. Phys. Rev. A 41, 2005–2020. https://doi.org/10.1103/PhysRevA.41.2005

Lin, M.Y., Lindsay, H.M., Weitz, D.A., Ball, R.C., Klein, R.A., Meakin, P., 1989. Universality in colloid aggregation. Nature 339, 360–362. https://doi.org/10.1038/339360a0

Line, V.L.S., Remondetto, G.E., Subirade, M., 2005. Cold gelation of β-lactoglobulin oil-in-water emulsions. Food Hydrocoll. 19, 269–278. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.06.004

Liu, H., Jiang, N., Liu, L., Sheng, X., Shi, A., Hu, H., Yang, Y., Wang, Q., 2016. Extraction, purification and primary characterization of polysaccharides from defatted peanut (Arachis hypogaea) cakes. Molecules 21, 1–13. https://doi.org/10.3390/molecules21060716

Liu, J., Li, P., Jiang, Z., Yang, R., Zhang, W., 2019. Characterisation of peanut protein concentrates from industrial aqueous extraction processing prepared by spray and freeze drying methods. Int. J. Food Sci. Technol. 54, 1597–1608. https://doi.org/10.1111/ijfs.14028

Liu, K., Stieger, M., van der Linden, E., van de Velde, F., 2014. Fat droplet characteristics affect rheological, tribological and sensory properties of food gels. Food Hydrocoll. 44, 244–259. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.034

Liu, Y., Zhao, G., Ren, J., Zhao, M., Yang, B., 2011. Effect of denaturation during extraction on the conformational and functional properties of peanut protein isolate. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 12, 375–380. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.01.012

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.., 2014. Noncovalent Bonds, in: Molecular Cell Biology. New York, pp. 1–7

Lorand, J., Basse, B., 2018. Procédé de préparation d'un gel alimentaire de protéines d'arachide, gel obtenu et son utilisation. WO 2019/073174 Al.

Lucey, J.A., Singh, H., 1997. Formation and physical properties of acid milk gels: A review. Food Res. Int. 30, 529–542. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5

Ma, T., Zhu, H., Wang, J., Wang, Q., Yu, L.L., Sun, B., 2017. Influence of extraction and solubilizing treatments on the molecular structure and functional properties of peanut protein. LWT - Food Sci. Technol. 79, 197–204. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.037

Mac Ritchie, F., 1998. Reversibility of Protein Adsorption, in: Möbius, D., Miller, R. (Eds.), Proteins at Liquid Interfaces. Elsevier Science B.V., Sydney, pp. 149–177. https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0012

Maltais, A., Remondetto, G.E., Gonzalez, R., Subirade, M., 2005. Formation of soy protein isolate cold-set gels: Protein and salt effects. J. Food Sci. 70, C67–C73. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09023.x

Mandelbrot, B., 1977. The Fractal Geometry of Nature, 1st Editio. ed. W.H. Freeman and Company, New York

Manski, J.M., Kretzers, I.M.J., van Brenk, S., van der Goot, A.J., Boom, R.M., 2007. Influence of dispersed particles on small and large deformation properties of concentrated caseinate composites. Food Hydrocoll. 21, 73–84. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.02.002

Mason, M.E., Johnson, B.R., Hamming, M., 1966. Flavor Components of Roasted Peanuts. Some Low Molecular Weight Pyrazines and a Pyrrole. J. Agric. Food Chem. 14, 454–460

McClements, D.J., 2015. Food Emulsions, Third Edit. ed. Taylor & Francis, Boca Raton

McClements, D.J., Monahan, F.J., Kinsella, J.E., 1993. Effect of Emulsion Droplets on the Rheology of Whey Protein Isolate Gels. J. Texture Stud. 24, 411–422. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1993.tb00051.x

McConnell, B., Farag, I.H., 2013. Kinetics Study of the Solvent Extraction of Lipids from Chlorella vulgaris. Int. J. Eng. Tech. Res. 1, 28–37

Mehalebi, S., 2008. Agrégation et gélification de la beta-lactoglobuline: Influence des interactions électrostatiques. Université du Maine

Message, J.-L., Sok, N., Assifaoui, A., Saurel, R., 2013. Thermal Denaturation of Pea Globulins (*Pisum sativum* L.)—Molecular Interactions Leading to Heat-Induced Protein Aggregation. J. Agric. Food Chem. 61, 1196–1204. https://doi.org/10.1021/jf303739n

Mezzenga, R., Fischer, P., 2013. The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. Reports Prog. Phys. 76. https://doi.org/10.1088/0034-4885/76/4/046601

Mikola, J., Yatsu, L.Y., Jacks, T.J., Hebert, J.J., 1975. Disruption of certain aleurone grains by various homogenization agents. Plant Cell Physiol. 16, 933–937

Misra, J.B., 2001. Variation in Nitrogen-to- Protein Conversion Factor for Peanut. Peanut Sci. 25, 48–51

Mitropoulos, V., Mütze, A., Fischer, P., 2014. Mechanical properties of protein adsorption layers at the air/water and oil/water interface: A comparison in light of the thermodynamical stability of proteins. Adv. Colloid Interface Sci. 206, 195–206. https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.004

Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M.F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R.M., Wal, J.M., Bernard, H., 2005. Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. J. Agric. Food Chem. 53, 4547–4553. https://doi.org/10.1021/jf050091p

Monteiro, P.V., Prakash, V., 1994. Functional properties of homogeneous protein fractions from peanut (Arachis hypogaea L.). J. Agric. Food Chem. 42, 274–278. https://doi.org/10.1021/jf00038a009

Morel, A., Mantrand, N., Belaid, S., Lopez, M., Chéreau, D., Demaille, C., Pailler, S., Valter, F., Galet, O., Gueguen, J., Kapel, R., Pizzi, A., Guarrigue, F., 2016. Le marché potentiel des tourteaux broyés, leurs propriétés fonctionnelles et applications. Oilseeds fats, Crop. Lipids 23, 1–13

Moretzsohn, M. de C., Hopkins, M.S., Mitchell, S.E., Kresovich, S., Francisco, J., Valls, M., Ferreira, M.E., 2004. Genetic diversity of peanut (Arachis hypogaea L .) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. BMC Plant Biol. 10, 1–10. https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-11

Morris, E.R., 2009. Functional Interactions in Gelling Biopolymer Mixtures, in: Food Gels. Elsevier Inc., pp. 167–198. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00005-7

Motoki, M., Kumazawa, Y., 2000. Recent Research Trends in Transglutaminase Technology for Food Processing. Food Sci. Technol. Res. 6, 151–160

Mujoo, R., Trinh, D.T., Ng, P.K.W., 2003. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. Food Chem. 82, 265–273. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00547-2

Muller, R., Gérard, E., Dugand, P., Rempp, P., Gnanou, Y., 1991. Rheological Characterization of the Gel Point: A New Interpretation. Macromolecules 24, 1321–1326

Murray, D.E., Maurice, T.J., Barker, L.D., 1981. Protein binder in food compositions. 4247573

Mwasaru, M.A., Muhammad, K., Bakar, J., Man, Y.B.C., 1999. Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (Cajanus cajan) and cowpea (Vigna unguiculata) protein isolates. I. Physicochemical properties. Food Chem. 67, 435–443. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00150-8

Nautiyal, P.C., 2002. Groundnut, Post-harvest operations. FAO; ICAR; AGSI

Némethy, G., Scheraga, H.A., 1962. The structure of water and hydrophobic bonding in proteins. III. The thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins. J. Phys. Chem. 66, 1773–1789. https://doi.org/10.1021/j100816a004

Nichols, G., Atchley, D.W., 1925. The Influence of Protein Concentration on the Conductivity of Human Serum. J. Biol. Chem. 65, 729–734

Nicolai, T., Chassenieux, C., 2019. Heat-induced gelation of plant globulins. Curr. Opin. Food Sci. 27, 18–22. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.04.005

Niemczycki, S., Galecki, J., 1938. Conductibilité électrique spécifique du lait et nouveaux dispositifs pour sa détermination. Lait 180, 1009–1032

Nieto Nieto, T.V., Wang, Y., Ozimek, L., Chen, L., 2016. Improved thermal gelation of oat protein with the formation of controlled phase-separated networks using dextrin and carrageenan polysaccharides. Food Res. Int. 82, 95–103. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.027

Nikiforidis, C. V., 2019. Structure and functions of oleosomes (oil bodies). Adv. Colloid Interface Sci. 274, 102039. https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102039

Nylander, T., 1998. Protein-Lipid Interactions, in: Möbius, D., Miller, R. (Eds.), Proteins at Liquid Interfaces. Elsevier Science B.V., pp. 385–430. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

O'Kane, F.E., Hape, R.P., Vereijken, J.M., Gruppen, H., van Boekel, M.A.J.S., 2004. Heat-Induced Gelation of Pea Legumin: Comparison with Soybean Glycinin. J. Agric. Food Chem. 52, 5071–5078. https://doi.org/10.1021/JF035215H

Ollivier, V., Ollivier, D., Artaud, J., 2015. Analyse des lipides. Techniques de l'ingenieur

Pace, C.N., Scholtz, J.M., Grimsley, G.R., 2014. Forces stabilizing proteins. FEBS Lett. 588, 2177–2184. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.006

Pattee, H.E., Isleib, T.G., Giesbrecht, F.G., McFeeters, R.F., 2000. Investigations into genotypic variations of peanut carbohydrates. J. Agric. Food Chem. 48, 750–756. https://doi.org/10.1021/jf9910739

Pattee, H.E., Purcell, A.E., 1967. Carotenoid Pigments of Peanut Oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 44, 328–330

Pattee, H.E., Purcell, A.E., Johns, E.B., 1969. Changes in Carotenoid and Oil Content During Maturation of Peanut Seeds. J. Am. Oil Chem. Soc. 46, 629–631

Pauling, L., 1960. The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals: An Introduction to Modern Structural Chemistry, Third Edit. ed. Cornell University Press, New York

Pelgrom, P.J.M., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2015. Method Development to Increase Protein Enrichment During Dry Fractionation of Starch-Rich Legumes. Food Bioprocess. Technol. 8, 1495–1502. https://doi.org/10.1007/s11947-015-1513-0

Pelkman, C.L., Fishell, V.K., Maddox, D.H., Pearson, T.A., Mauger, D.T., Kris-Etherton, P.M., 2004.

Effects of moderate-fat (from monounsaturated fat) and low-fat weight-loss diets on the serum lipid profile in overweight and obese men and women. Am. J. Clin. Nutr. 79, 204–212

Peng, Y., Kersten, N., Kyriakopoulou, K., van der Goot, A.J., 2020. Functional properties of mildly fractionated soy protein as influenced by the processing pH. J. Food Eng. 275, 109875. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109875

Pickering, S.U., 1907. Emulsions. J. Chem. Soc. 91, 2001–2021. https://doi.org/10.1002/9781119220510.ch15

Pons, R., Erra, P., Solans, C., Ravey, J.C., Stébé, M.J., 1993. Viscoelastic properties of gel-emulsions: Their relationship with structure and equilibrium properties. J. Phys. Chem. 97, 12320–12324. https://doi.org/10.1021/j100149a036

Pouzot, M., Benyahia, L., Nicolai, T., 2004a. Dynamic mechanical characterization of the heat-induced formation of fractal globular protein gels. J. Rheol. (N. Y. N. Y). 48, 1123–1134. https://doi.org/10.1122/1.1781168

Pouzot, M., Nicolai, T., Durand, D., Benyahia, L., 2004b. Structure Factor and Elasticity of a Heat-Set Globular Protein Gel. Macromolecules 37, 614–620

Prakash, V., Rao, M.S.N., 1986. Physicochemical properties of oilseed proteins. CRC Crit. Rev. Biochem. 20, 265–363

Preece, K.E., Hooshyar, N., Zuidam, N.J., 2017. Whole soybean protein extraction processes: A review. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 43, 163–172. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.024

Ramaswamy, H.S., 2009. Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties, Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties. CRC Press, Boca Raton

Renkema, J.M.S., Knabben, J.H.M., van Vliet, T., 2001. Gel formation by beta-conglycinin and glycinin and their mixtures. Food Hydrocoll. 15, 407–414

Revoredo, C.L., Fletcher, S.M., 2002. World Peanut Market : An Overview of the Past 30 Years. Athens

Ridel, L., 2016. Émulsions de Pickering : approche théorique et applications : analyse physico-chimique des phénomènes interfaciaux : obtention d'émulsions de Pickering nanométriques de manière spontanée et d'émulsions foisonnées de Pickering. Claude Bernard- Lyon I

Rocha, C., Teixeira, J.A., Hilliou, L., Sampaio, P., Gonçalves, M.P., 2009. Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems. Food Hydrocoll. 23, 1734–1745. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.005

Roger, V., 2015. Viscosité et dynamique microscopique dans les suspensions colloïdales concentrées. Université de Montpellier

Romeih, E., Walker, G., 2017. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. Trends Food Sci. Technol. 62, 133–140. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.015

Romero-Guzmán, M.J., Petris, V., De Chirico, S., di Bari, V., Gray, D., Boom, R.M., Nikiforidis, C. V., 2020. The effect of monovalent (Na+, K+) and divalent (Ca2+, Mg2+) cations on rapeseed oleosome (oil body) extraction and stability at pH 7. Food Chem. 306, 125578. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125578

Rosa, P., Sala, G., van Vliet, T., van de Velde, F., 2006. Cold gelation of whey protein emulsions. J. Texture Stud. 37, 516–537. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2006.00066.x

Sala, G., van Aken, G.A., Stuart, M.A.C., van de Velde, F., 2007. Effect of droplet-matrix interactions on large deformation properties of emulsion-filled gels. J. Texture Stud. 38, 511–535. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2007.00110.x

Sala, G., van Vliet, T., Cohen Stuart, M.A., van Aken, G.A., van de Velde, F., 2009a. Deformation and fracture of emulsion-filled gels: Effect of oil content and deformation speed. Food Hydrocoll. 23, 1381–1393. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.11.016

Sala, G., van Vliet, T., Cohen Stuart, M.A., van de Velde, F., van Aken, G.A., 2009b. Deformation and fracture of emulsion-filled gels: Effect of gelling agent concentration and oil droplet size. Food Hydrocoll. 23, 1853–1863. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.002

Sariçay, Y., 2014. New Insight into Enzymatic Cross-linking of Globular Proteins : From Nanostructure to Functionality. Wageningen University

Schirack, A. V., Drake, M.A., Sanders, T.H., Sandeep, K.P., 2006a. Characterization of aroma-active compounds in microwave blanched peanuts. J. Food Sci. 71, 513–520. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00173.x

Schirack, A. V., Drake, M.A., Sanders, T.H., Sandeep, K.P., 2006b. Impact of Microwave Blanching on the Flavor of Roasted Peanuts. J. Sens. Stud. 21, 428–440

Schmidt, R.H., Illingworth, B.L., Ahmed, E.M., 1978. Heat-Induced Gelation of Peanut Protein/Whey Protein Blends. J. Food Sci. 43, 613–615

Schutyser, M.A.I., Pelgrom, P.J.M., van der Goot, A.J., Boom, R.M., 2015. Dry fractionation for sustainable production of functional legume protein concentrates. Trends Food Sci. Technol. 45, 327–335. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.013

Schwenke, K.D., 1998. Proteins: Some principles of classification and structure, in: Möbius, D., Miller, R. (Eds.), Proteins at Liquid Interfaces. Elsevier Science B.V., pp. 1–50. https://doi.org/10.1016/S1383-7303(98)80048-3

Segat, A., Misra, N.N., Fabbro, A., Buchini, F., Lippe, G., Cullen, P.J., Innocente, N., 2014. Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. Food Res. Int. 66, 365–372. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.002

Shafiqur, R., Islam, A., Rahman, M.M., Uddin, M.B., Mazumder, A.R., 2018. Isolation of Protein from Defatted Peanut Meal and Characterize their Nutritional Profile. Chem. Res. J. 3, 187–196

Sharma, C.B., Dieckert, J.W., 1975. Isolation and Partial Characterization of Globoids from Aleurone Grains of Arachis hypogaea Seed. Physiol. Plant. 33, 1–7. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1975.tb03754.x

Shen, X., Fang, T., Gao, F., Guo, M., 2017. Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation. Food Hydrocoll. 63, 668–676. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.003

Sheppard, A.J., Rudolf, T.S., 1991. Analysis of Peanuts and Peanut Products for Total Lipids , Fatty Acids and Proximates. Peanut Sci. 18, 51–54

Shi, X., Davis, J.P., Xia, Z., Sandeep, K.P., Sanders, T.H., Dean, L.O., 2017a. Characterization of peanuts after dry roasting, oil roasting, and blister frying. LWT - Food Sci. Technol. 75, 520–528. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.030

Shi, X., Dean, L.O., Davis, J.P., Sandeep, K.P., Sanders, T.H., 2018. The effects of different dry roast parameters on peanut quality using an industrial belt-type roaster simulator. Food Chem. 240, 974–979. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.130

Shi, X., Sandeep, K.P., Davis, J.P., Sanders, T.H., Dean, L.L., 2017b. Kinetics of color development of peanuts during dry roasting using a batch roaster. J. Food Process Eng. 40, 1–9. https://doi.org/10.1111/jfpe.12498

Shih, W.-H., Liu, J., Shih, W.Y., Kim, S., Sarikaya, M., Aksay, I.A., 1989. Mechanical properties of colloidal gels. Mat. Res. Soc. Symp. Proc. 155, 83–92

Shih, W.-H., Shih, W.Y., Kim, S., Liu, J., Aksay, I.A., 1990. Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels. Phys. Rev. A 42

Slade, L., Levine, H., 2006. Optimization of roasting process and product quality of peanuts. J. Therm. Anal. Calorim. 83, 163–166. https://doi.org/10.1007/s10973-005-7069-x

Southgate, D.A.T., 1969. Determination of carbohydrates in foods. I.—Available carbohydrate. J. Sci. Food Agric. 20, 326–330. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740200602

Spotti, M.J., Tarhan, O., Schaffter, S., Corvalan, C., Campanella, O.H., 2017. Whey protein gelation induced by enzymatic hydrolysis and heat treatment : Comparison of creep and recovery behavior. Food Hydrocoll. 63, 696–704. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.014

Stading, M., Langton, M., Hermansson, A.M., 1992. Inhomogeneous fine-stranded β-lactoglobulin gels. Food Hydrocoll. 6, 455–470. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80031-3

Stalker, H.T., 1997. Peanut (Arachis hypogaea L.). F. Crop. Res. 53, 205–217. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00032-4

Stalker, H.T., Wilson, R.F., 2016. Peanuts: Genetics, Processing, and Utilization, Elsevier. ed, Peanuts: Genetics, Processing, and Utilization. Nikki Levy. https://doi.org/10.1016/C2015-0-00075-2

Stone, A.K., Karalash, A., Tyler, R.T., Warkentin, T.D., Nickerson, M.T., 2015. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. Food Res. Int. 76, 31–38. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017

Suárez López, M.M., Kizlansky, A., López, L.B., 2006. Assessment of protein quality in foods by calculating the amino acids score corrected by digestibility. Nutr. Hosp. 21, 47–51

Sun, Q., Xiong, L., Bu, X., Liu, Y., 2012. Study on mechanism of cross-linking of peanut protein isolate modified with transglutaminase. Adv. Mater. Res. 550–553, 1304–1308. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.550-553.1304

Sun, X., Jin, H., Li, Y., Feng, H., Liu, C., Xu, J., 2018. The molecular properties of peanut protein: Impact of temperature, relative humidity and vacuum packaging during storage. Molecules 23. https://doi.org/10.3390/molecules23102618

Sun, X.D., Arntfield, S.D., 2012. Molecular forces involved in heat-induced pea protein gelation: Effects of various reagents on the rheological properties of salt-extracted pea protein gels. Food Hydrocoll. 28, 325–332. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.014

Sun, X.D., Arntfield, S.D., 2011. Dynamic oscillatory rheological measurement and thermal properties of pea protein extracted by salt method: Effect of pH and NaCl. J. Food Eng. 105, 577–582. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.008

Sun, X.D., Arntfield, S.D., 2010. Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. Food Hydrocoll. 25, 25–31. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.002

Surel, C., Foucquier, J., Perrot, N., Mackie, A.R., Garnier, C., Riaublanc, A., Anton, M., 2014. Composition and structure of interface impacts texture of O/W emulsions. Food Hydrocoll. 34, 3–9. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.016

Surendar, J.M., 1982. Fractionation of protein mixtures by salt addition followed by dialysis treatment. 4321192

Tanford, C., 1962. Contribution of Hydrophobic Interactions to the Stability of the Globular Conformation of Proteins. J. Am. Chem. Soc. 84, 4240–4247. https://doi.org/10.1021/ja00881a009

Tobitani, A., Ross-Murphy, S.B., 1997. Heat-induced gelation of globular proteins. 1. Model for the effects of time and temperature on the gelation time of BSA gels. Macromolecules 30, 4845–4854. https://doi.org/10.1021/ma970112j

Tombs, M.P., Newsom, B.G., Wilding, P., 1974. Protein Solubility: Phase Separation in Arachin-Salt-Water Systems. Int. J. Pept. Protein Res. 6, 253–277. https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1974.tb02384.x

Toomer, O.T., 2017. Nutritional Chemistry of the Peanut (Arachis hypogaea). Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 58, 3042–3053. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1339015

Tornberg, E., Hermansson, A.M., 1977. Functional Characterization of Protein Stabilized Emulsions: Effect of Processing. J. Food Sci. 42, 468–472.

Totosaus, A., Montejano, J.G., Salazar, J.A., Guerrero, I., 2002. A review of physical and chemical protein-gel induction. Int. J. Food Sci. Technol. 37, 589–601. https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00623.x

Tran, T., Rousseau, D., 2013. Stabilization of acidic soy protein-based dispersions and emulsions by soy soluble polysaccharides. Food Hydrocoll. 30, 382–392. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.001

Triggiani, V., Tafaro, E., Giagulli, V., Sabba, C., Resta, F., Licchelli, B., Guastamacchia, E., 2009. Role of Iodine, Selenium and Other Micronutrients in Thyroid Function and Disorders. Endocrine, Metab. Immune Disord. - Drug Targets 9, 277–294. https://doi.org/10.2174/187153009789044392

Turgeon, S.L., Laneuville, S.I., 2009. Protein + Polysaccharide Coacervates and Complexes: From Scientific Background to their Application as Functional Ingredients in Food Products, in: Modern Biopolymer Science. Elsevier Inc., pp. 327–363. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00011-2

Twomey, M., Keogh, M.K., Mehra, R., Okennedy, B.T., 1997. Gel characteristics of beta-lactoglobulin, whey protein concentrate and whey protein isolate. J. Texture Stud. 28, 387–403. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1997.tb00124.x

Tzen, J.T.C., 2012. Integral Proteins in Plant Oil Bodies. ISRN Bot. https://doi.org/10.5402/2012/173954

Tzen, J.T.C., Liel, G.C., Huang, A.H.C., 1992. Characterization of the Charged Components and Their Topology on the Surface of Plant Seed Oil Bodies. J. Biol. Chem. 22, 15626–15634

Urbonaite, V., van der Kaaij, S., De Jongh, H.H.J., Scholten, E., Ako, K., van der Linden, E., Pouvreau, L., 2016. Relation between gel stiffness and water holding for coarse and fine-stranded protein gels. Food Hydrocoll. 56, 334–343. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.011

Uruakpa, F.O., 2012. Gelling Behavior of Plant Proteins and Polysaccharides in Food Systems. J. Food Sci. Eng. 2, 247–256

USDA, 2016. Food Composition Databases. Available online. URL https://www.usda.gov/ (accessed 6.4.19)

Utsumi, S., Kinsella, J.E., 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, 1278–1282. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10461.x

V 08-059, 2002. Dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies à 25 °C. AFNOR

Vaca Medina, G., 2010. Elaboration des émulsions natives issues des graines oléoprotéagineuses et transformation catalytique de la fraction lipidique en biolubrifiants écolabellisables. Université de Toulouse

van Aken, G.A., Oliver, L., Scholten, E., 2015. Rheological effect of particle clustering in gelled dispersions. Food Hydrocoll. 48, 102–109. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.001

van der Linden, E., Foegeding, E.A., 2009. Gelation: Principles, Models and Applications to Proteins, in: Modern Biopolymer Science. Elsevier Inc., Wageningen, pp. 29–91. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00002-1

van der Poel, C., 1958. On the rheology of concentrated dispersions. Rheol. Acta 1, 198–205. https://doi.org/10.1002/actp.1984.010350801

van Vliet, T., 1988. Rheological properties of filled gels. Influence of filler matrix interaction. Colloid Polym. Sci. 266, 518–524. https://doi.org/10.1007/BF01420762

van Vliet, T., Luyten, H., Walstra, P., 1991. Fracture and yielding of gels, in: Dickinson, E. (Ed.), Food Polymers, Gels and Colloids. Royal Society of Chemistry, pp. 392–403

Verma, A.K., Kumar, S., Das, M., Dwivedi, P.D., 2012. Impact of Thermal Processing on Legume Allergens. Plant Foods Hum. Nutr. 67, 430–441. https://doi.org/10.1007/s11130-012-0328-7

Vishwanathan, K.H., Singh, V., Subramanian, R., 2011. Influence of particle size on protein extractability from soybean and okara. J. Food Eng. 102, 240–246. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.08.026

Wang, L., Liu, H., Liu, L., Wang, Q., Li, Q., Du, Y., Zhang, J., 2014. Protein Contents in Different Peanut Varieties and Their Relationship to Gel Property. Int. J. Food Prop. 17, 1560–1576. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.723660

Wang, L., Liu, H., Liu, L., Wang, Q., Li, S., Li, Q., 2017. Prediction of peanut protein solubility based on the evaluation model established by supervised principal component regression. Food Chem. 218, 553–560. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.091

Wang, Q., 2017. Peanut Processing Characteristics and Quality Evaluation. Springer Nature, Beinjing, China. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6175-2

Wang, Q., 2016. Peanuts: Processing Technology and Product Development, Elsevier. ed. Nikki Levy, Beijing

Wereley, N.M., Chaudhuri, A., Yoo, J., John, S., Kotha, S., Suggs, A., Radhakrishnan, R., Love, B.J., Sudarshan, T.S., 2006. Bidisperse Magnetorheological Fluids using Fe Particles at Nanometer and Micron Scale. J. Intell. Mater. Syst. Struct. 17, 393–401. https://doi.org/10.1177/1045389X06056953

Whitehurst, R.J., van Oort, M., 2009. Enzymes in Food Technology. Blackwell Publishing

WHO, 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition., World Health Organization technical report series

Wu, H., Morbidelli, M., 2001. A Model Relating Structure of Colloidal Gels to Their Elastic Properties. Langmuir 17, 1030–1036

Wu, H., Wang, Q., Ma, T., Ren, J., 2009. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. Food Res. Int. 42, 343–348. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.006

Wu, M., Wang, J., Hu, J., Li, Z., Liu, R., Liu, Y., Cao, Y., Ge, Q., Yu, H., 2020. Effect of typical starch on the rheological properties and NMR characterization of myofibrillar protein gel. J. Sci. Food Agric. 100, 258–267. https://doi.org/10.1002/jsfa.10033

Yan, K.P., Hao, J., Dan, N., Chen, C., 2008. A simple and improved method for extraction of phospholipids from hemoglobin solutions. Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol. 36, 19–33. https://doi.org/10.1080/10731190701857751

Yang, C., 2016. Plant protein gel formation mechanisms and their applications as delivery systems of bioactive compounds. University of Alberta

Yang, M., Liu, F., Tang, C.H., 2013. Properties and microstructure of transglutaminase-set soy protein-stabilized emulsion gels. Food Res. Int. 52, 409–418. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.012

Yang, Z., 2009. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. J. Biotechnol. 144, 12–22. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.04.011

Yasumaru, F., Lemos, D., 2014. Species specific in vitro protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 426–427, 74–84. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.012

Yatsu, L.Y., Jacks, T.J., 1972. Spherosome Membranes - Half Unit Membranes. Plant Physiol. 49, 937–943

Ye, A., Taylor, S., 2009. Characterization of cold-set gels produced from heated emulsions stabilized by whey protein. Int. Dairy J. 19, 721–727. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.06.003

Yoshida, H., Hirakawa, Y., Tomiyama, Y., Nagamizu, T., Mizushina, Y., 2005. Fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in peanut seeds (Arachis hypogaea L.) following microwave treatment. J. Food Compos. Anal. 18, 3–14. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.12.004

Young, C.T., Pattee, H.E., Schadel, W.E., Sanders, T.H., 2006. Ultrastructural Development of Starch Granules in Peanut (Arachis hypogaea L., NC7) Cotyledonary Cells. Peanut Sci. 33, 60–63. https://doi.org/10.3146/0095-3679(2006)33[60:UDOSGI]2.0.CO;2

Young, C.T., Schadel, W.E., 1991. Microstructure of Peanut (Arachis hypogaea L . cv . Florigiant) Cotyledons after Oil Cooking. J. Food Sci. 56, 76–79

Young, C.T., Schadel, W.E., 1990a. Microstructure of Peanut Seed : A Review. Food Struct. 9, 317–328

Young, C.T., Schadel, W.E., 1990b. Transmission and Scanning Electron Microscopy of Peanut (Arachis hypogaea L . CV . Florigiant) Cotyledon After Roasting. Food Struct. 9, 69–73

Young, C.T., Schadel, W.E., 1984. Effect of Environment on the Physical Structure of the Peanut (Arachis hypogaea L .). J. Food Struct. 3, 185–190

Young, V.R., Pellett, P.L., 1994. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 59, 1203–1212. https://doi.org/10.1093/ajcn/59.5.1203S

Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I., 2007. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. Food Chem. 103, 121–129. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.012

Yuliana, M., Truong, C.T., Huynh, L.H., Ho, Q.P., Ju, Y.H., 2014. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: Influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. LWT - Food Sci. Technol. 55, 621–626. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.022

Zaaboul, F., Raza, H., Chen, C., Liu, Y., 2018. Characterization of Peanut Oil Bodies Integral Proteins , Lipids , and Their Associated Phytochemicals. J. Food Sci. 83, 93–100. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13995

Zhai, J., Wooster, T.J., Hoffmann, S. V., Lee, T.H., Augustin, M.A., Aguilar, M.I., 2011. Structural rearrangement of β-lactoglobulin at different oil-water interfaces and its effect on emulsion stability. Langmuir 27, 9227–9236. https://doi.org/10.1021/la201483y

Zhang, S.B., Lu, Q.Y., 2015. Characterizing the structural and surface properties of proteins isolated before and after enzymatic demulsification of the aqueous extract emulsion of peanut seeds. Food Hydrocoll. 47, 51–60. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.007

Zhu, Y. dan, Li, D., Wang, L. jun, 2019. Dynamic rheological properties of peanut protein isolate and aggregation suspension and acid-induced gel. Powder Technol. 358, 95–102. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.052

Zhuang, Y., Dreskin, S.C., 2013. Redefining the major peanut allergens. Immunol. Res. 55, 125–134. https://doi.org/10.1007/s12026-012-8355-x

Ziegler, G.R., Foegeding, E.A., 1990. The gelation of proteins, in: Advances in Food and Nutrition Research. Academic Press, Inc., pp. 203–298

ANNEXES

Annexe I : Propriétés de la transglutaminase

Figures et Tableaux Supplémentaires du chapitre I

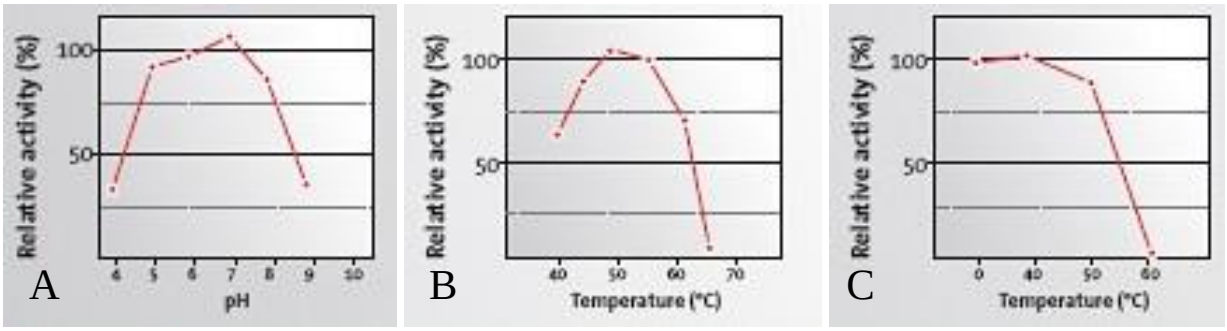


Figure S1: Activité relative de la transglutaminase. A) Activité en fonction du pH ; B) Activité en fonction de la température ; C) Stabilité en fonction de la température (Arnold, 2014)

Température (°C)	Temps requis pour l'inactivation (min)
65	~ 120
70	15
75	5
80	1

Tableau S1 : Durée pour l'inactivation thermique de la transglutaminase (Arnold, 2014)

Annexe II : Caractérisation des gels par mesure de texture

Figures et Tableaux Supplémentaires du chapitre III

Les propriétés mécaniques ont été déterminées à grande déformation sur des gels formés dans des tubes en polypropylène. Les tubes ont été chauffés au bain-marie à la température de 25°C initiale pendant 10 minutes puis la température de consigne (90°C ou 95°C pour un traitement thermique, et 40°C ou 45°C pour un traitement enzymatique) est fixée à la température souhaitée selon le procédé choisi. Un protocole de chauffage a été défini pour que la cinétique de chauffe du bain-marie soit représentative de celle imposée dans le rhéomètre. Ces cinétiques sont représentées sur la figure S2. Les cinétiques thermiques ont été suivies au bain-marie à l'aide d'un thermomètre placé au cœur d'un produit témoin au cours de la gélification.

Après application de cette cinétique de montée et descente en température dans un rhéomètre, nous avons pu observer les mêmes propriétés rhéologiques (module élastique G', tan δ) pour des gels formés à partir de fraction intermédiaire qu'avec la cinétique initiale du rhéomètre (montée et descente en température de 3,5°C/min).

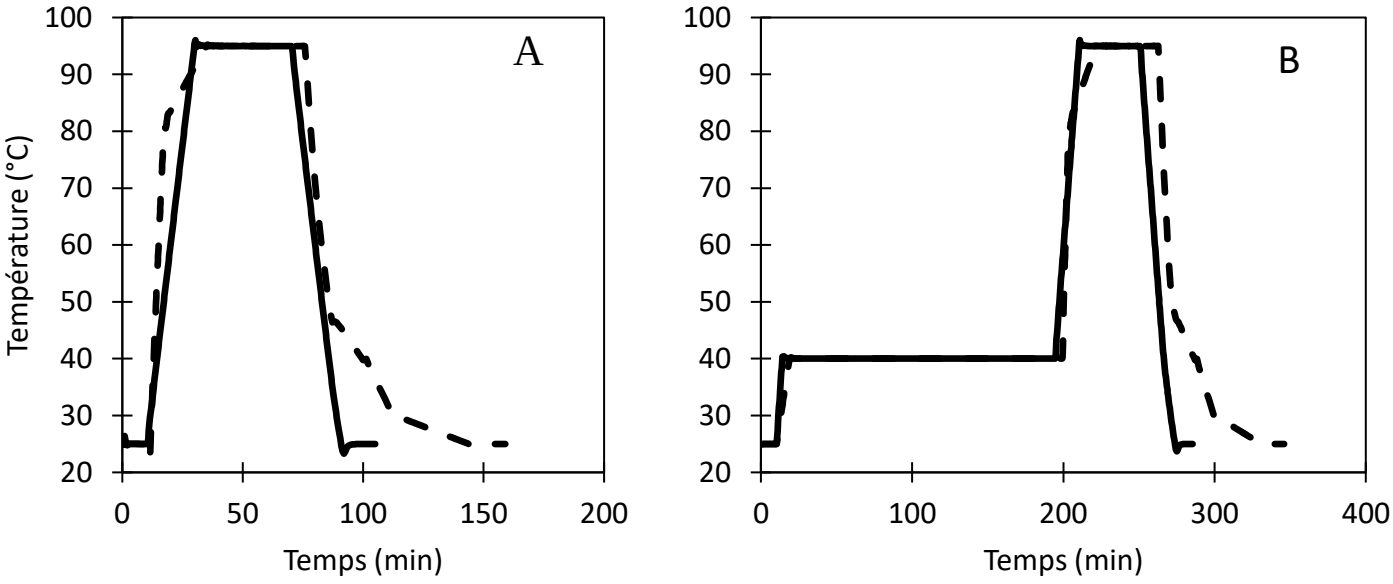


Figure S2 : Comparaison des traitements thermiques appliqués lors d'une gélification dans le rhéomètre (trait plein) ou au bain-marie (trait pointillé). Cas d'une gélification sans prétraitement enzymatique (A) et avec un prétraitement enzymatique (B)

Les gels sont caractérisés par mesure de texture selon un protocole mis en place dans l'entreprise (Basse et al., 2018). L'analyse de texture s'effectue à l'aide d'un TA.XT *plus* de Stable MicroSystems (Royaume-Uni) équipé d'une sonde cônique en polyméthacrylate de méthyle, de 4,5 cm de diamètre et d'angle 90°.

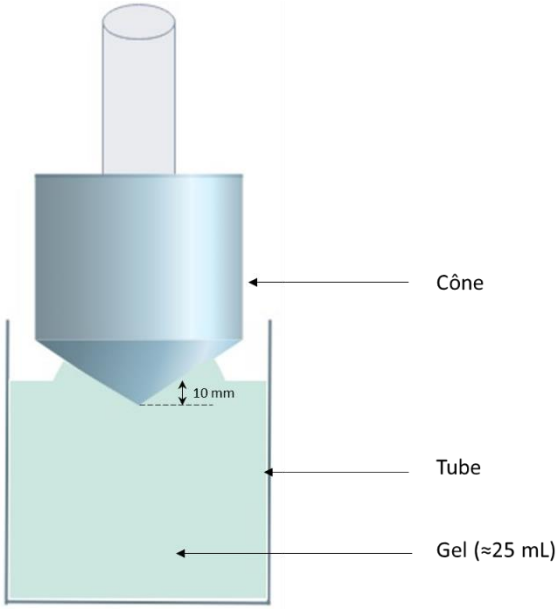


Figure S3 : Schéma du dispositif de mesure de texture des gels formés au bain-marie

Pour la mesure, la sonde est amenée manuellement à la surface de l'échantillon dans son tube (pointe du cône au centre de la surface) avant de démarrer le protocole de mesure (figure D3).

Au cours de la mesure, le cône pénètre dans le produit à une vitesse de 0,5 mm/sec sur une profondeur de 10 mm, puis remonte à sa position initiale à une vitesse de 1 mm/sec. La température de la pièce est régulée T= 20±2°C. On trace alors l'évolution de la force (exprimée en Newton), en fonction de la distance (exprimée en mm) parcourue par la sonde dans l'échantillon (voir figure S4). De ces données est extraite la force maximale (en N), qui sera ensuite appelée « Force de gel » dans la suite du manuscrit.

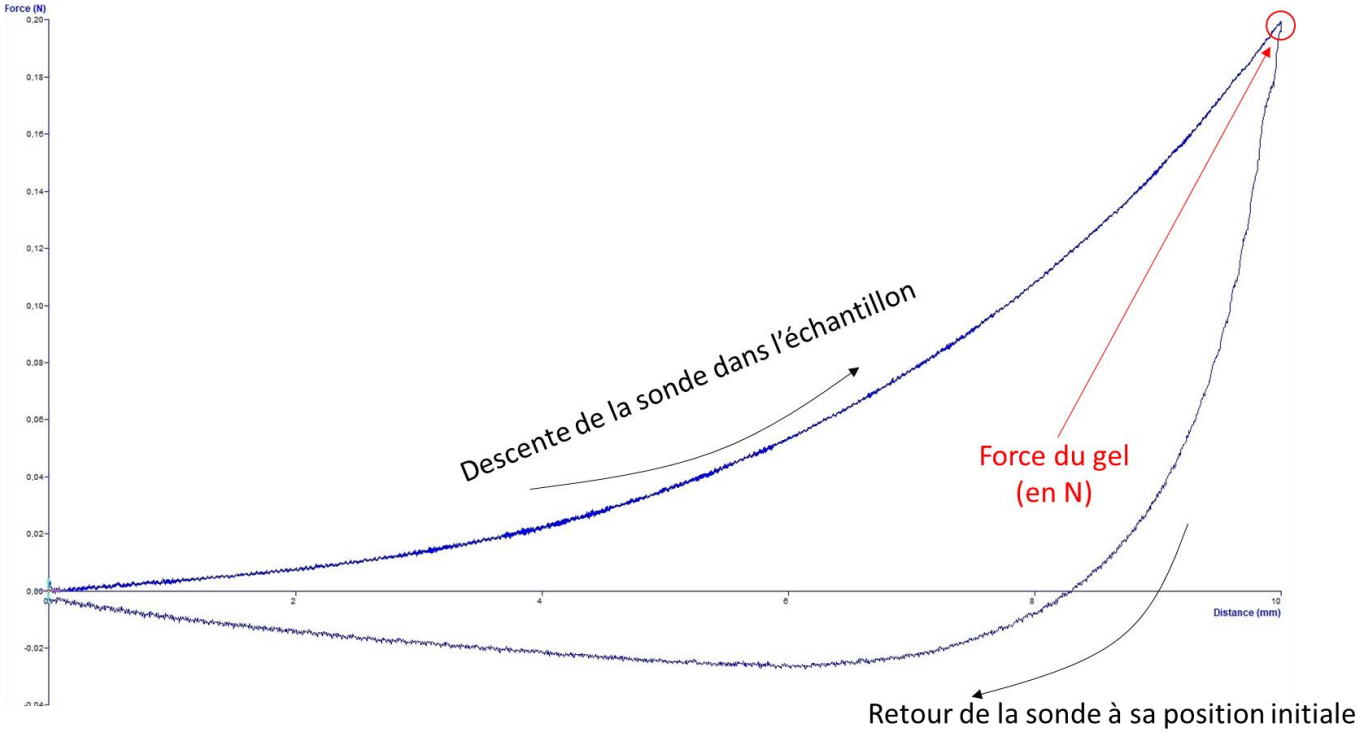


Figure S4 : Courbe type d'une mesure de texture d'un gel de suspension d'arachide. La force mesurée est représentée en fonction de la distance de pénétration de la sonde dans le gel

La précision de cette mesure est de 0,01 N, dans une fenêtre de sensibilité comprise entre 0,05 et 50 N. Par conséquent, certains échantillons trop peu structurés n'ont pas pu être évalués par cette méthode.

Annexe III : Caractérisation texturale des mix gélifiés

Figures et Tableaux Supplémentaires du chapitre IV

Les mesures de rhéologie sont réalisées *in situ*, avec gélification du produit dans la cuve du cylindre coaxial. On cherche ici à démontrer la faisabilité d'étudier les propriétés physiques des gels de protéines d'arachide par une autre technique de mesure, sur des gels formés en batchs au bain-marie, avec la même méthode de préparation utilisée pour l'observation des gels par microscopie confocale. Cela permettra d'établir un lien entre les mesures de rhéologies effectuées et les mesures de texture couramment mises en place dans l'entreprise.

Pour cette étude, des gels formés dans des tubes en plastiques chauffés au bain-marie sont soumis à un test en indentation avec un cône et la réponse du matériau à la déformation est mesurée au fur et à

mesure de la descente de la sonde dans le gel. La force maximale mesurée après pénétration de la sonde conique dans l'échantillon, sur une distance de 10 mm, atteignait une valeur de l'ordre de 1 N pour les gels formés avec prétraitement enzymatique, contre une valeur de l'ordre de 0,1 N pour les gels formés par traitement thermique seul, indépendamment de la force ionique (figure S5).

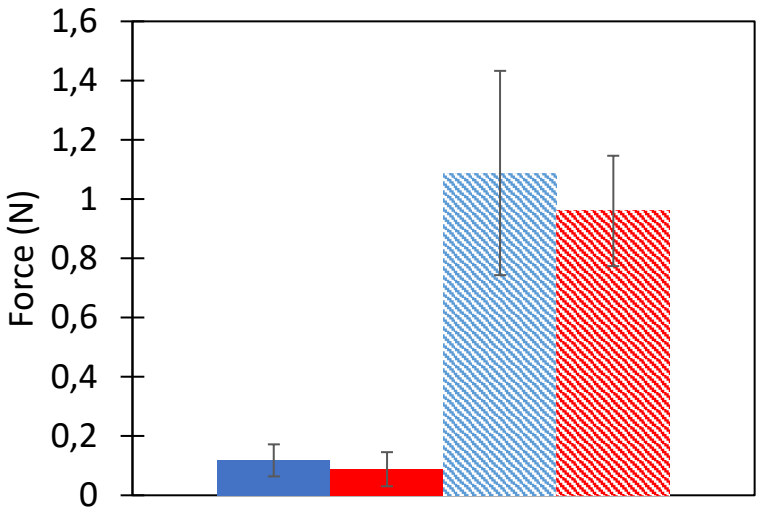


Figure S5 : Force de gel (mesurée par pénétrométrie), pour des gels produits à partir du mix par traitement thermique (barres pleines) ou un traitement thermique précédé d'un traitement enzymatique (barres rayées). Echantillon à force ionique 0,5 mol/L (bleu) ou 0,8 mol/L (rouge).

Annexe IV : Comparaison entre mesures rhéologiques et propriétés texturales sur des gels de protéines

Figures et Tableaux Supplémentaires du chapitre V

Pour cette étude, des gels formés dans des tubes en polyprolylène chauffés au bain-marie sont soumis à un test en indentation avec un cône et la réponse du matériau à la déformation est mesurée au fur et à mesure de la descente de la sonde dans le gel. On observe une augmentation de la force de gel (maximum de force mesuré par une sonde cônique après une indentation de 10 mm à 0,5 mm/s dans le gel) en fonction de la concentration en protéines, pour chacune des conditions d'extraction et de gélification. Le procédé de gélification utilisée (TT ou eTT) ne semble pas avoir d'impact sur les valeurs de force de gel obtenues. On observe une force de gel maximale atteinte par les gels formés à 0,5 mol/L 1,4 fois plus importante que celle atteinte par ceux formés à 0,8 mol/L, toutes conditions confondues. Ces observations sont similaires à celles issues des mesures de modules élastiques (figure

S6). Bien qu'une certaine variabilité soit observée, on note tout de même une tendance similaire entre l'évolution de la force de gel et celle du module élastique finale. Un plus grand nombre d'échantillons, notamment à 0,8 mol/L permettraient de confirmer cette relation.

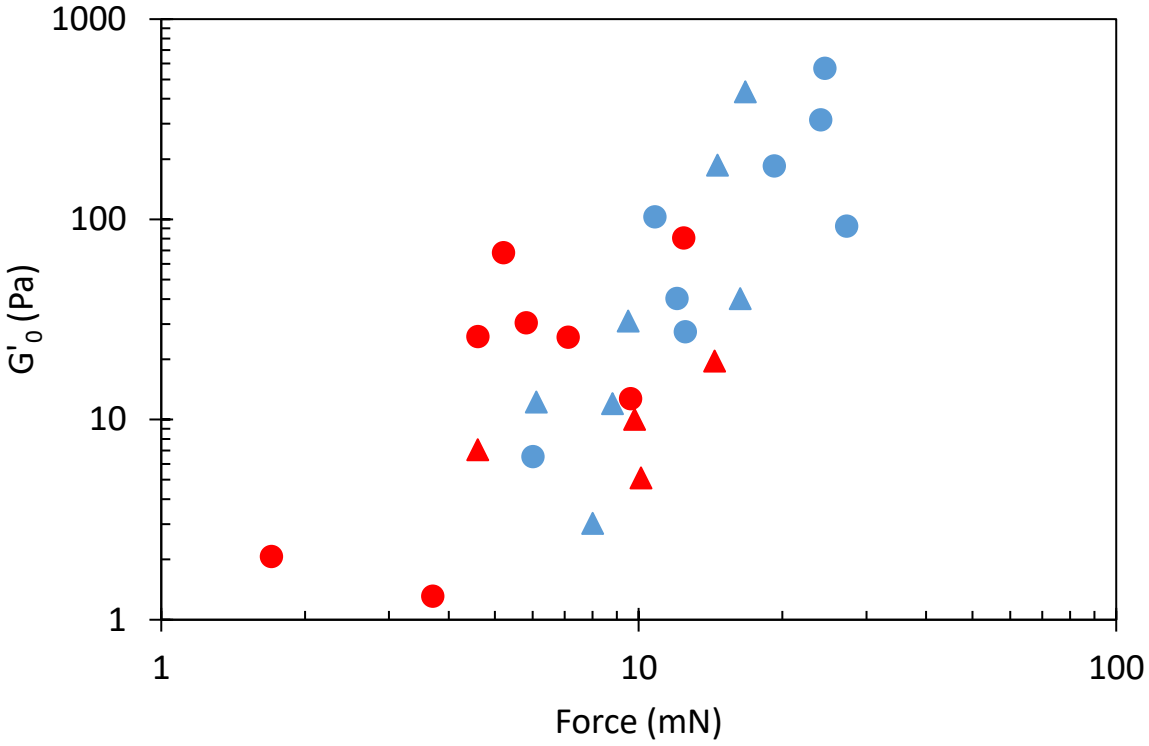


Figure S6 : Module élastique (déterminés à faible déformation, en rhéomètre) en fonction de la force de gel (mesurée par pénétrométrie), pour des gels produits par traitement thermique (TT, ronds) ou un traitement thermique précédé d'un traitement enzymatique (eTT, triangles). Echantillon à force ionique 0,5 mol/L (bleu) ou 0,8 mol/L (rouge).

Annexe V : Caractérisation par microscopie confocale des mélanges surnageant/fraction intermédiaire avant gélification

Figures et Tableaux Supplémentaires du chapitre VI

Les différents échantillons formés à partir de mélanges de la fraction intermédiaire et du surnageant ont été observés avant gélification. Oon observe dans l'échantillon à 0% de lipides des traces de gouttelettes (figure S7). Lorsque la fraction volumique de lipides dans l'échantillon augmente, on observe bien sur le signal de marqueur de lipide une augmentation de la concentration de corps lipidique. Dans le signal afférent aux protéines, on observe dans les systèmes à 7 % et 25 % (v/v) de

lipide des éléments ronds en surbrillance. Ces éléments témoignent d'une organisation protéique. Ces éléments sont plus gros dans la suspension à 25 % de lipides et non visualisés pour des concentrations à 40 % et n'est observé dans aucun des systèmes à 0,8 M. L'observation du signal lipidique met en évidence la présence de lipides organisés autour de ces éléments. Le nombre et la taille de gouttelettes, ainsi que la quantité de lipides autour d'elles diminuent avec la fraction volumique de gouttelettes lipidiques. On peut considérer ici avoir un système de corps lipidiques d'arachides en suspension dans la phase aqueuse et une émulsion eau/eau. Il pourrait s'agir d'une dispersion de gouttelettes concentrées en protéines dans ce cas, l'émulsion eau/eau se serait formé pendant la centrifugation et serait stabilisée par des corps lipidiques (les oléosomes), à la manière d'une émulsion de Pickering. En surface des oléosomes, les oléosines qui présentent une partie hydrophile et une partie hydrophobe seraient alors capable de stabiliser cette gouttelette de phase continue tout en maintenant intact la structure de l'oléosome (Karefyllakis et al., 2019; Pickering, 1907). Ce phénomène est dépendant de la force ionique, car il n'a été observé sur aucun échantillon extrait à 0,8 mol/L. On peut donc en déduire que les forces d'attraction responsables de ce phénomène (présentent à 0,5 mol/L de NaCl) sont, à 0,8 mol/L de NaCl, absentes ou surpassées par des forces de répulsion supérieures. A une force ionique de 0,5 mol/L, l'énergie libre d'interactions est donc dominée par les forces attractives de Van der Waals, tandis qu'à 0,8 mol/L cette énergie libre d'interaction est dominée par des forces de répulsions électrostatiques (Dickinson, 2014; Elbers et al., 2016; Ridel, 2016). Cela peut également être dû à un phénomène de coacervation qui serait survenu à température ambiante à 0,8 mol/L et non à 0,5 mol/L, en raison de la différence de concentration en arachine et en conarachine (Tombs et al., 1974). Des observations au microscope confocale du surnageant et des échantillons après traitement enzymatique et avant traitement thermique permettraient de confirmer respectivement la structure initiale du surnageant (avant mélange avec la fraction intermédiaire), et préciserait la température minimum à laquelle ce phénomène se défait ($95°C \geq x \geq 40°C$ ou $25°C \leq x \leq 40°C$). Nous pourrions ainsi déterminer la persistance de ce phénomène au cours des traitements de gélification. La différence de concentration en protéines et de répartition en arachine et conarachine complexifient également la compréhension de ce phénomène.

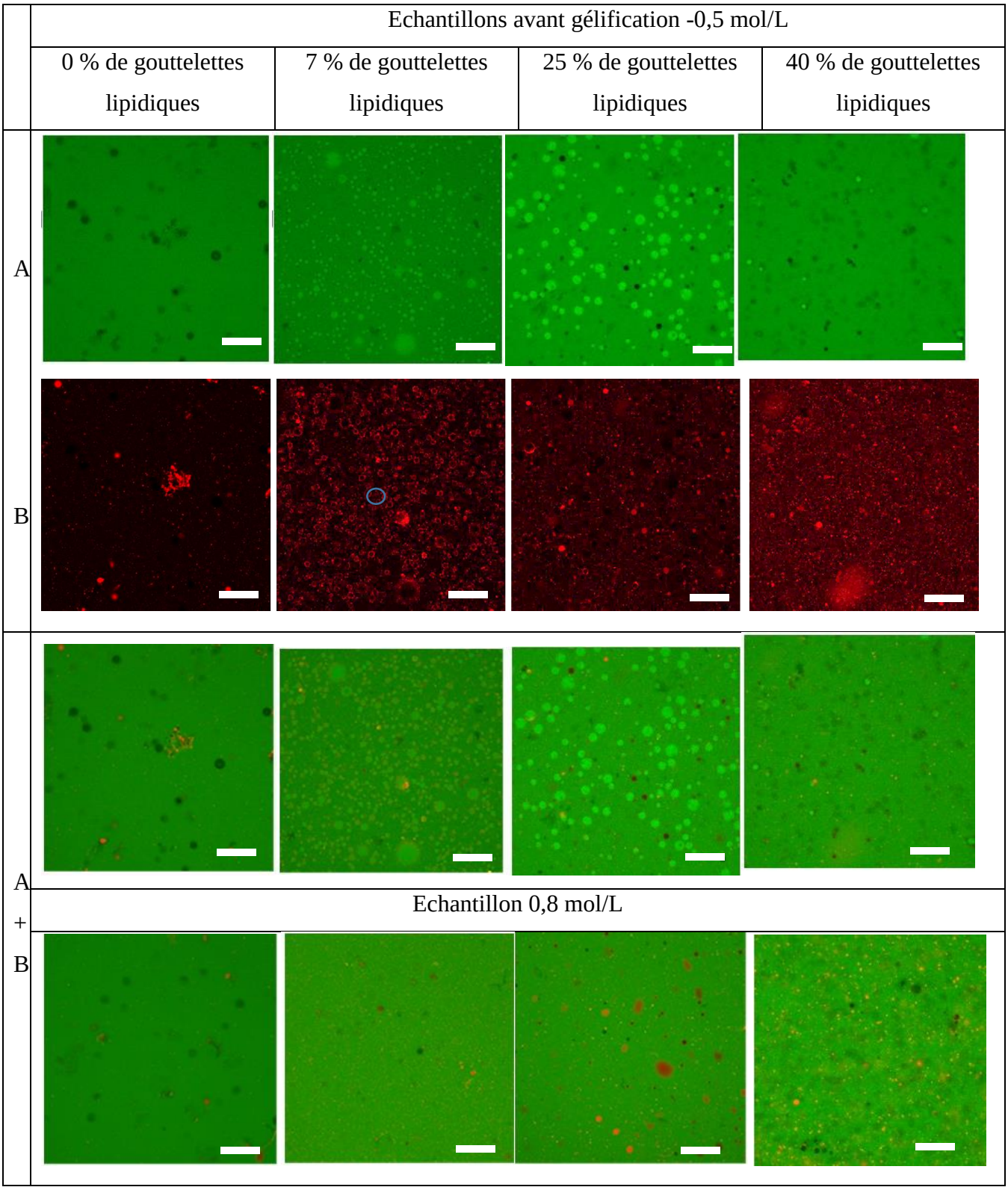


Figure S7 : Observation en microscopie confocale de suspensions de protéines d'arachide extraites à 0,5 mol/L et à 0,8 mol/L et contenant ϕ=0% ;7% ; 25% et 40% de gouttelettes lipidiques. Les protéines sont marquées en vert (image A) et les lipides sont marqués en rouge (image B). Echelle : 50 µm

université PARIS-SACLAY

ECOLE DOCTORALE N°581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Titre : Valorisation de la graine d'arachide broyée : rôle des différentes fractions dans la structuration par gélification d'une suspension aqueuse

Mots clés : Protéines végétales ; Gélification ; Structure ; Système multiphasique

Résumé : L'arachide (*Arachis Hypogaea* L.) est une légumineuse largement consommée dans les pays du Sud (Afrique, Asie et Amérique du Sud). Elle constitue dans ces pays un aliment peu coûteux, local et un apport nutritionnel de qualité. Cependant, les modes de consommation alternatifs à la graine d'arachide brute sont rares. Des produits alimentaires innovants à base de suspensions d'arachide gélifiées ont été développés par l'entreprise Onyx Développement. L'objectif de cette thèse est d'étudier les mécanismes de structuration de ces suspensions (*via* différents procédés physiques et enzymatiques), et les propriétés structurelles des gels formés. Des suspensions d'arachide ont été préparées par broyage, en présence d'eau salée, de graines préalablement blanchies. Nous avons montré que ces suspensions pouvaient gélifier par des procédés habituellement utilisés pour former des gels protéiques (acidification, traitement thermique et/ou action enzymatique). Les suspensions ont été fractionnées et la composition et le rôle dans le processus de gélification de chacune des fractions obtenues a été étudié. Les propriétés structurales des gels ont été évaluées par rhéologie et la microstructure du réseau observée par microscopie confocale. L'extraction des protéines à différentes forces ioniques nous a permis de solubiliser préférentiellement certaines globulines (arachine ou conarachine) et leur contribution respective à la structure du gel a été évaluée. L'effet de la concentration en protéines, de la fraction lipidique et de la fraction solide particulaire a notamment été caractérisé sur des gels obtenus par traitement thermique, avec ou sans prétraitement enzymatique à l'aide de transglutaminase.

Title : Valorization of the grinded peanut seed: role of the different fractions in the structuring by gelation of an aqueous suspension

Keywords : Plant proteins ; Gelation ; Structure; Multiphasic system

Abstract : The peanut (*Arachis Hypogaea* L.) is a legume widely consumed in southern countries (Africa, Asia and South-America). In these countries, it is an inexpensive, local food and a quality nutritional intake. However, alternative consumption patterns to raw peanut seed are rare. The company Onyx Développement has developed innovative food products based on gelled groundnut suspensions. The objective of this thesis is to study the structuring mechanisms of these suspensions (*via* different physical and enzymatic processes), and the structural properties of the gels formed. Peanut suspensions were prepared by grinding, in the presence of salt water, previously bleached seeds. We have shown that these suspensions can gel by processes usually used to form protein gels (acidification, heat treatment or enzymatic action). The suspensions were fractionated and each fraction was characterized in terms of composition and its role in the gelling process studied. The structural properties of the gels were evaluated by rheology and the microstructure of the network was observed by confocal microscopy. The extraction of proteins at different ionic strengths allowed us to preferentially solubilize certain globulins (arachin or conarachin) and their respective contribution to the gel structure was characterized. The effect of protein concentration, lipid fraction and particulate solid fraction were characterized in particular on gels obtained by heat treatment, with or without enzymatic pre-treatment with transglutaminase.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France