

# **Formation, structure et propriétés des agrégats de protéines**

**Marie-Hélène Famelart, Saïd Bouhallab, Fanny Guyomarc'h, Thomas Croguennec**

**UMR 1253 (INRA, Agrocampus Ouest) Science et Technologie du Lait et des Oeufs - RENNES**



# PLAN

- Introduction : la fonctionnalité des protéines laitières
- Description des protéines laitières
- Description des propriétés fonctionnelles
- Assemblages supramoléculaires des protéines sériques
- Modification des structures des protéines sériques en vue d'obtenir une nouvelle fonctionnalité
- Modification des agrégats de protéines sériques
- Conclusions/perspectives

# Protéines laitières et fonctionnalités

## ❑ Propriétés technologiques

- Organoleptiques (absence de couleur et de goût) ;
- Reconstitution (mouillage, dispersion, réhydratation) ;
- Solubilité (boissons) ;
- Propriétés épaississantes/viscosifiantes (soupes, sauces, yaourts) ;
- Capacité de rétention d'eau (boulangerie-viennoiserie) ;
- Propriétés gélifiantes (préparation gélifiées, desserts) ;
- Propriétés interfaciales :- émulsifiantes (préparations infantiles) ;
  - moussantes (couvertures foisonnées, desserts).

## ❑ Propriétés biologiques

- Balance aa ;
- Vecteurs/stabilisation (minéraux, vitamines..) ;
- Activités antibactériennes (lactoferrine, lactoperoxydase) ;
- Source de peptides bioactifs ;



## Principales qualités des ingrédients protéiques :

❑ **Coût**

❑ **Reproductibilité des fonctionnalités**

Maitrise des interactions produits/procédés

❑ **Amélioration de la qualité des produits finis**

Identifier les leviers structuraux de la fonctionnalité des protéines laitières

*(modifications contrôlées de la structure et organisation supramoléculaire des protéines laitières)*

# Protéines laitières et fonctionnalités

Histoire de la protéine  
(Traitements appliqués,  
stockage...)

Conditions physicochimiques du  
milieu (pH, force ionique,  
température...)

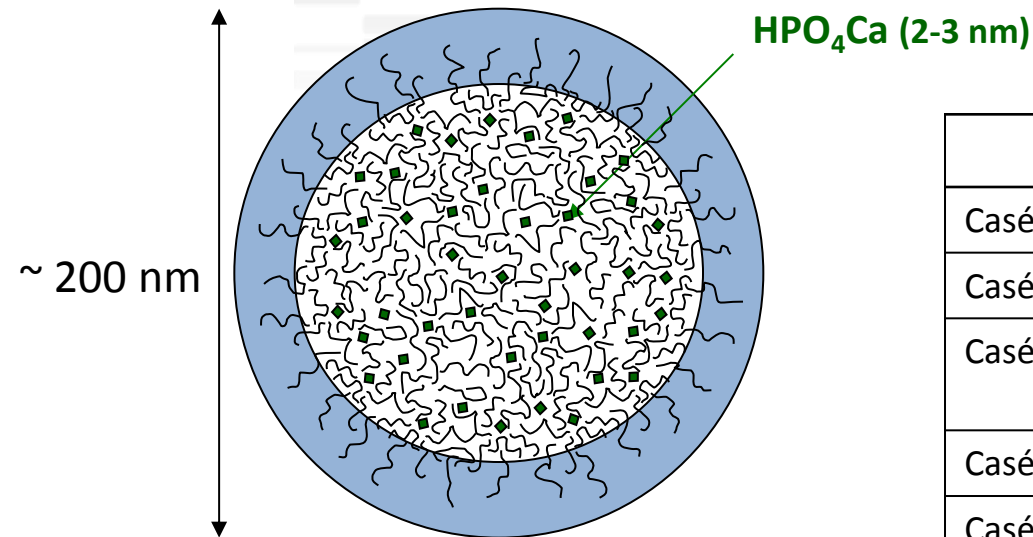
**Structure**  
(/organisation supramoléculaire)

**Interactions**  
(protéine – protéine ; protéine – solvant ;  
protéines – phase hydrophobe)

**Fonctionnalités des protéines**  
(Dispersion, solubilité, interfaciale, épaississante, gélifiante, stabilité thermique, etc.)

# La caséine

## 1.1. Structure

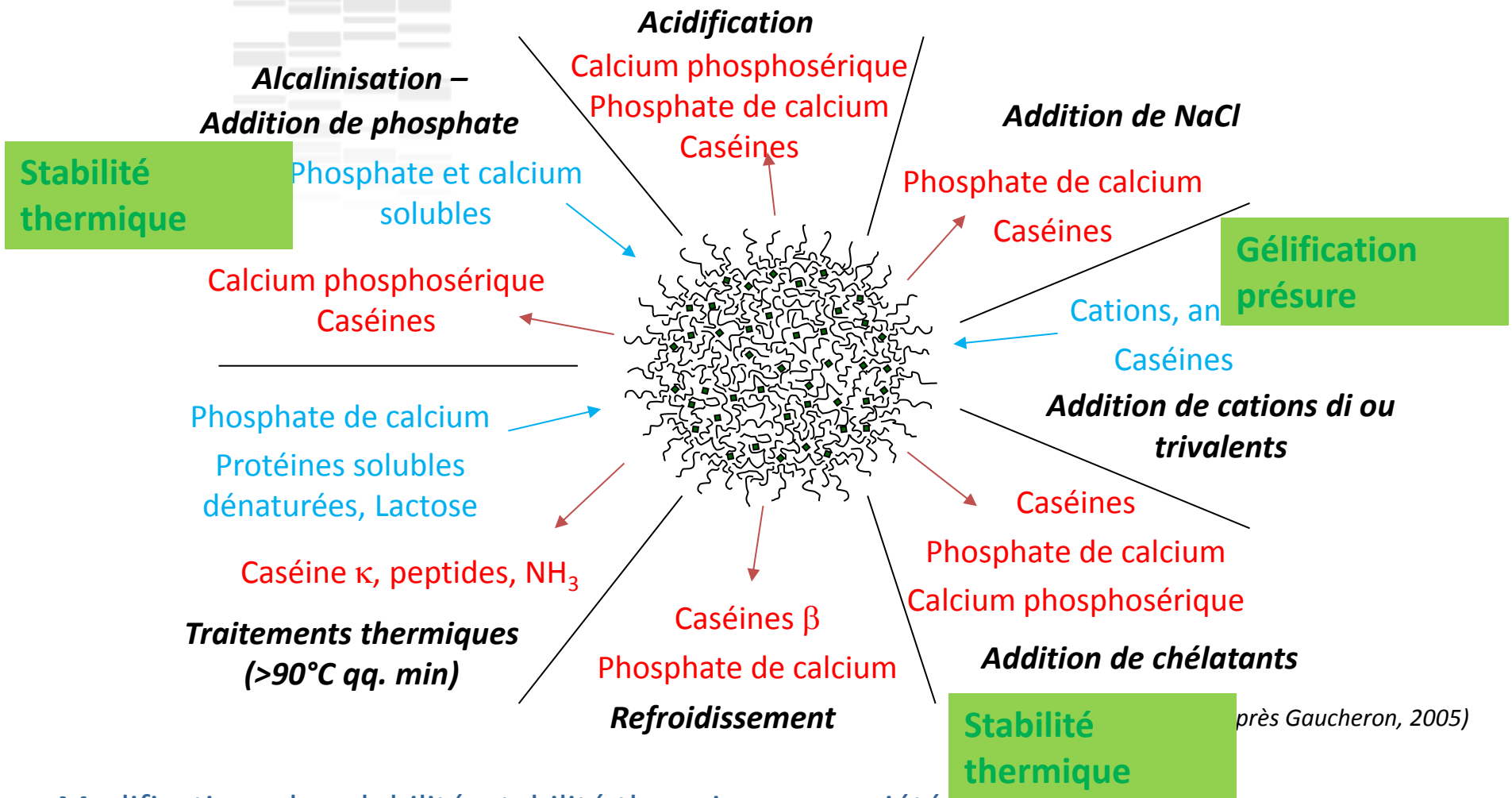


| Caséines              |           | Composants salins              |            |
|-----------------------|-----------|--------------------------------|------------|
| Caséine $\alpha_{s1}$ | 33        | Calcium                        | 2,9        |
| Caséine $\alpha_{s2}$ | 11        | Magnésium                      | 0,2        |
| Caséine $\beta$       | 33        | Phosphate inorganique          | 4,3        |
| Caséine $\kappa$      | 11        | Citrate                        | 0,5        |
| Caséine $\gamma$      | 4         |                                |            |
| <b>Total caséines</b> | <b>92</b> | <b>Total composants salins</b> | <b>8,0</b> |

Caséines → protéines non structurée  
→ assemblages en complexe micellaire

- **Structure micellaire qui est sensible à une modification des conditions de milieu** environnement ionique, pH, température, etc.

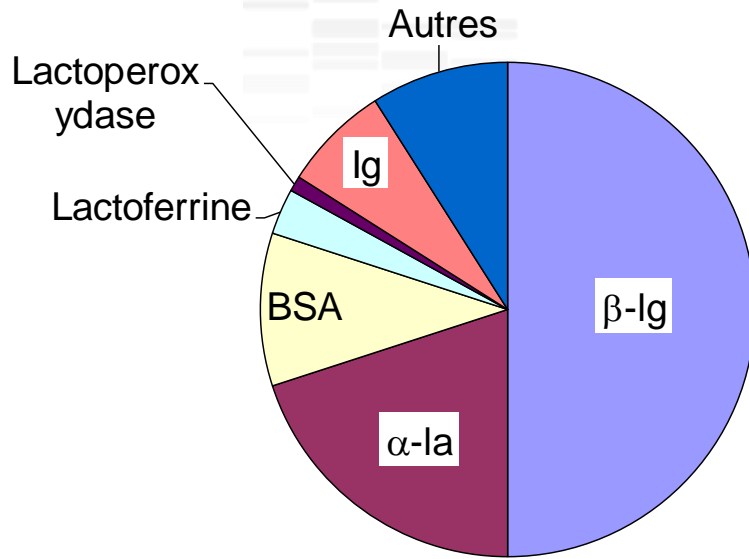
# Ses fonctionnalités



Modifications de solubilité, stabilité thermique, propriétés de gélification, etc.

# Les protéines sériques

## Structure



- structure globulaire
- majoritairement acides
- de petite taille (< 5 nm)

- Solubles à l'état natif sur la gamme des pH alimentaires
- Sensibilité thermique, interfaciale, etc.



## $\beta$ -lactoglobuline (3-4 g/L) :

❑ protéine majeure du lactosérum (vache)

❑ Structure:

162 acides aminés,

9 brins  $\beta$ ,

1 hélice  $\alpha$ ,

2 ponts disulfures

(cys66 – cys160; cys106 – cys119),

1 thiol libre

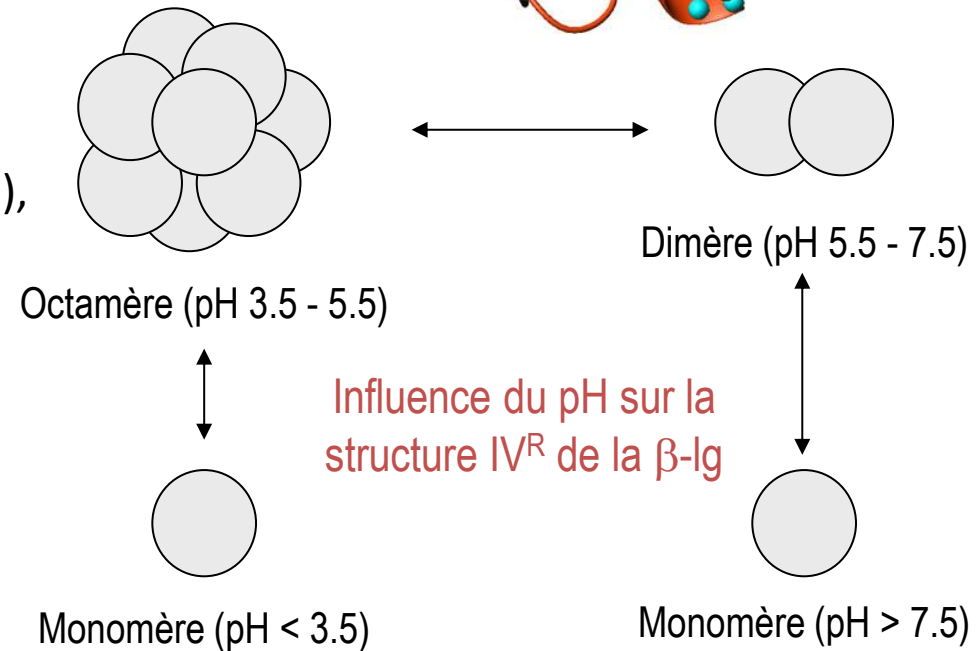
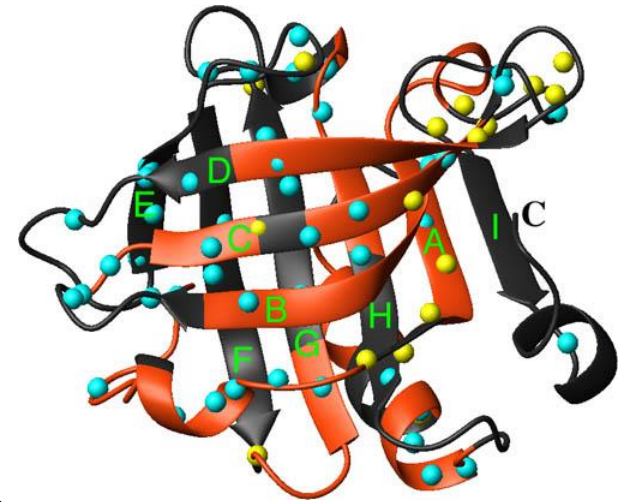
(cys121)

Poche hydrophobe

❑ Stabilité

pH

Température



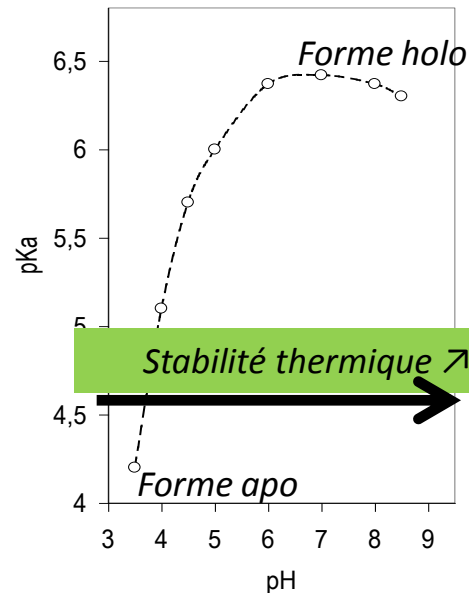
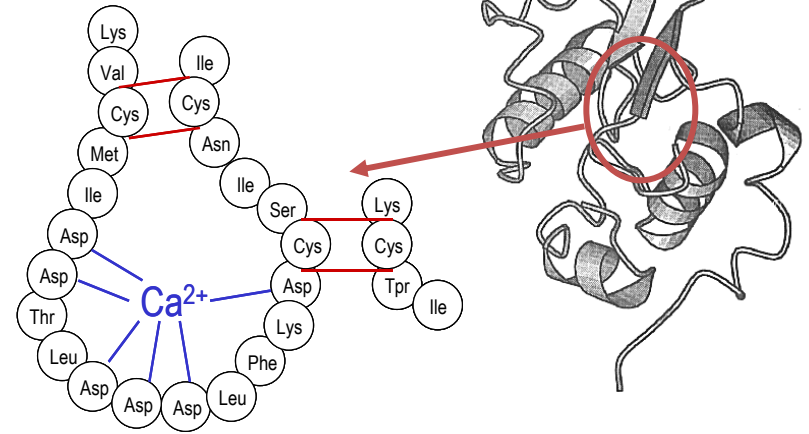
# $\alpha$ -lactalbumine (1-1.5 g/L) :

## Structure:

- 123 acides aminés,
- 2 brins  $\beta$ ,
- 4 hélices  $\alpha$ ,
- 4 ponts disulfures  
(cys6 – cys120; cys28 – cys111;  
cys61 – cys77; cys73 – cys91),
- 1 site spécifique de fixation du  $Ca^{2+}$

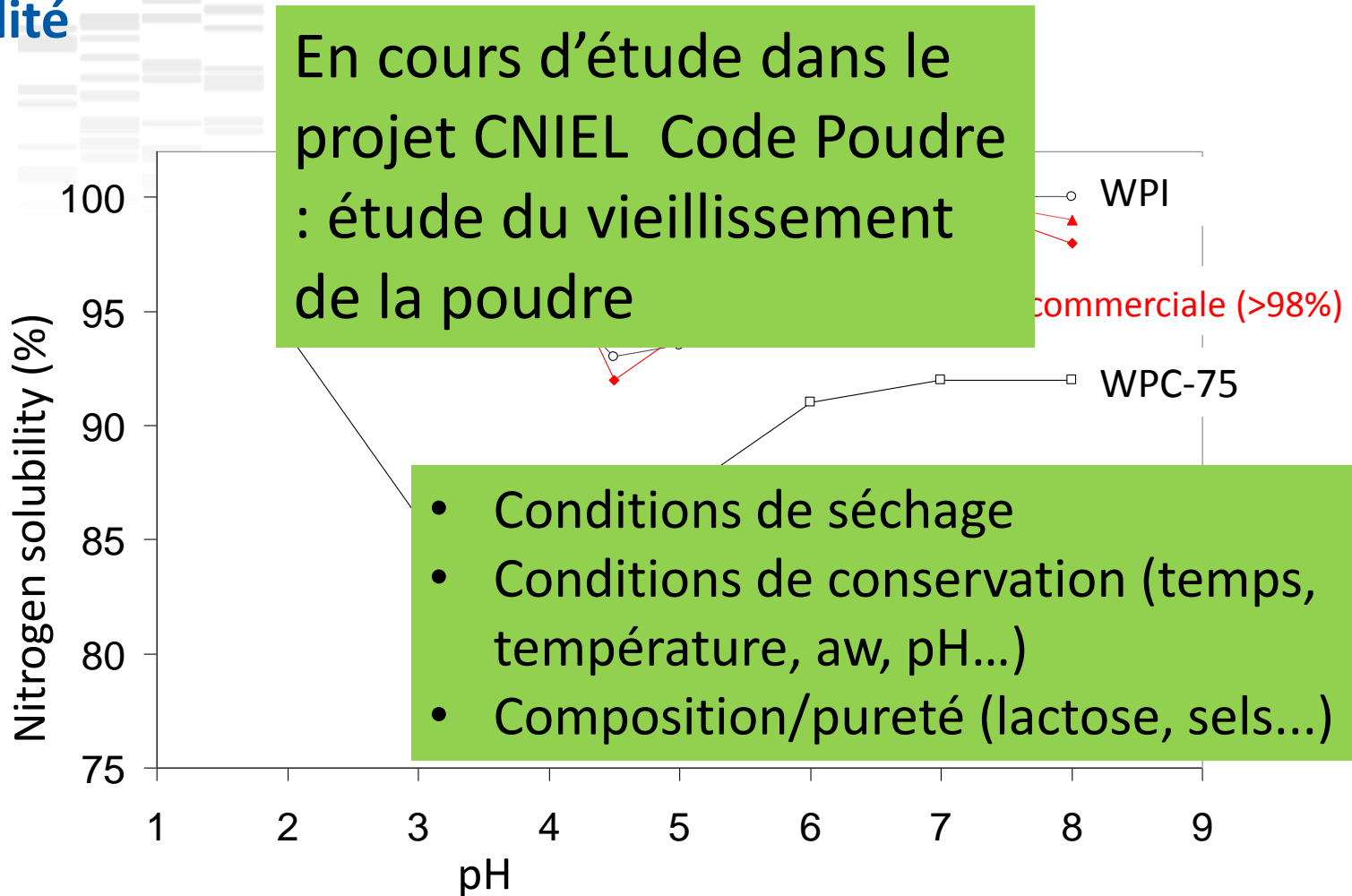
## Stabilité

- pH
- Complexant du calcium
- Température



Influence du pH sur la fixation du  $Ca^{2+}$  par l' $\alpha$ -la

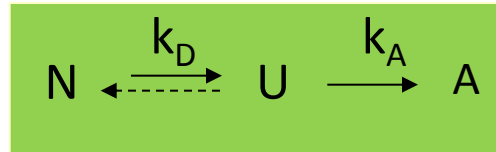
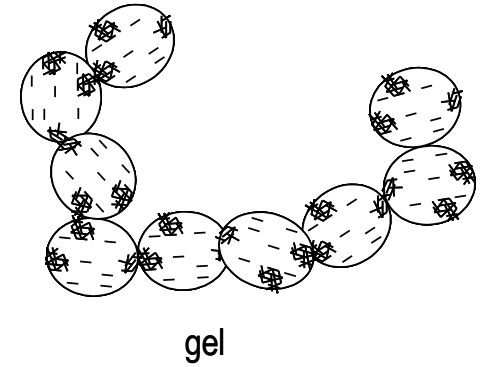
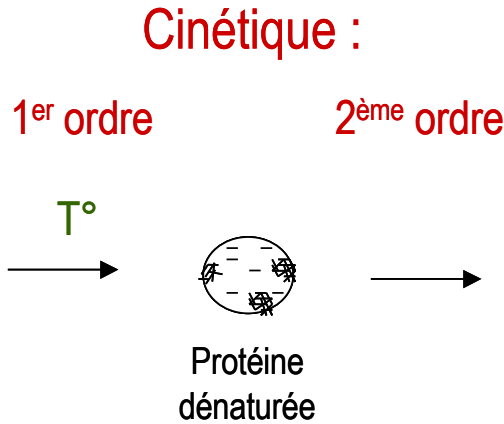
## Solubilité



Mehra R. 4th Food ingredient symposium, Cork, Ireland, 19-20 sept 2001.

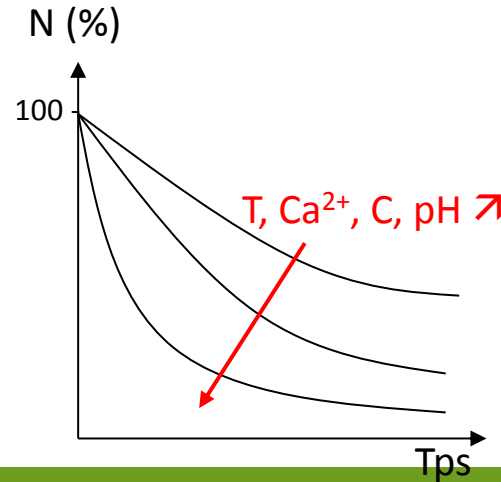
# Propriétés gélifiantes

- Charge négative
- Partie hydrophobe

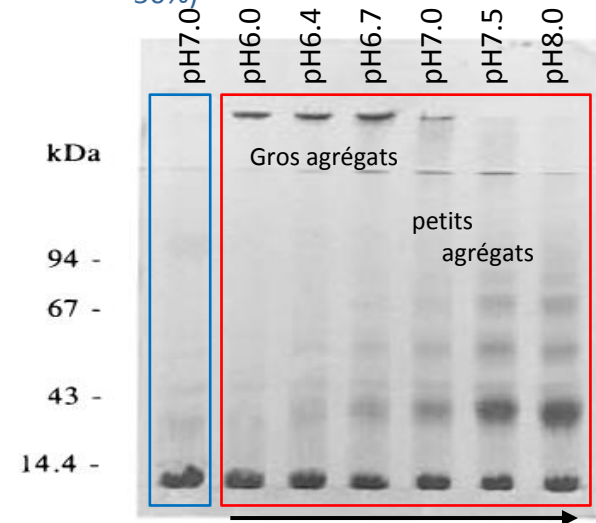


Facteurs :

- Température
- Concentration en protéine
- pH
- Force ionique
- Nature des sels ( $Ca^{2+}$ )
- Autres (ex: caséines, aa, etc.)



Effet du pH sur l'agrégation de la  $\beta$ Lg  
10g/L après un chauffage à 65°C ( $N_t/N_0 \approx 50\%$ )



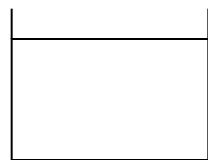
$k_\theta \nearrow$

Description des propriétés fonctionnelles

Hoffman & van Mil, JAFIC (1997)

.012

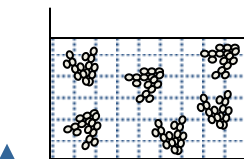
# Propriétés gélifiantes



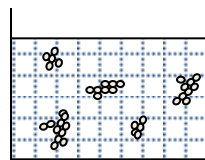
Solution protéique

Traitement thermique

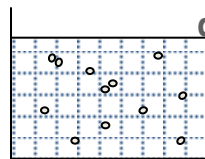
pH → pHi  
Force ionique



Gel turbide



Gel opaque



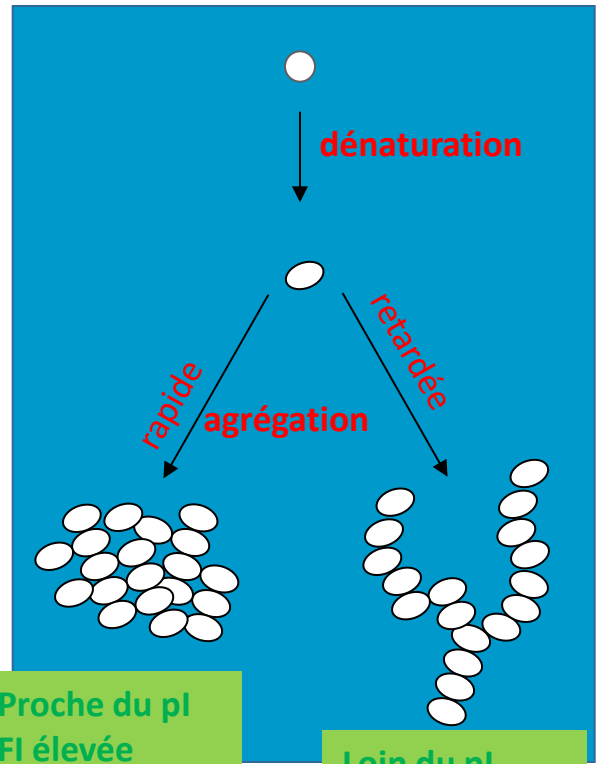
Gel transparent



Solution transparente

Fermeté ↑  
Capacité Rétention  
d'eau ↑

+ CaCl<sub>2</sub>  
+ GDL



Proche du pI  
FI élevée

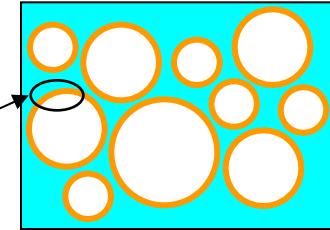
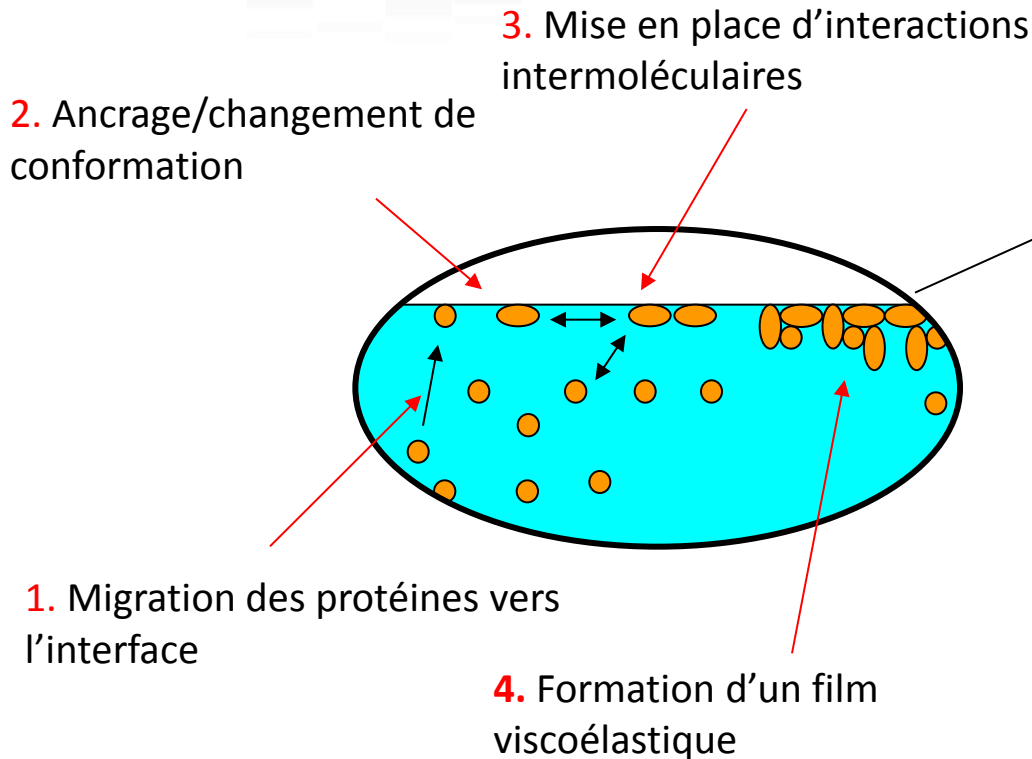
Loin du pI  
FI faible

Il reste des  
répulsions  
entre  
particules

Gélification à froid

# Propriétés interfaciales

= Aptitude à créer de l'interface et à stabiliser la phase dispersée (gaz, huile)



## Stabilisation des systèmes dispersés

- ☐ Mousses
  - drainage
  - murissement d'Ostwald

## Propriétés émulsifiantes d'agrégats de protéines sériques : projet PROFIL

- Agrégats fractals
  - **Agrégats microparticulaires**
  - Agrégats fibrillaires
- Etudes en cours

# Assemblages supramoléculaires de protéines sériques

## Agrégation “induite”

Structures fibrillaires et sphérulites

Structures particulières

Structures fractales

## Agrégation spontanée

Nanotubes

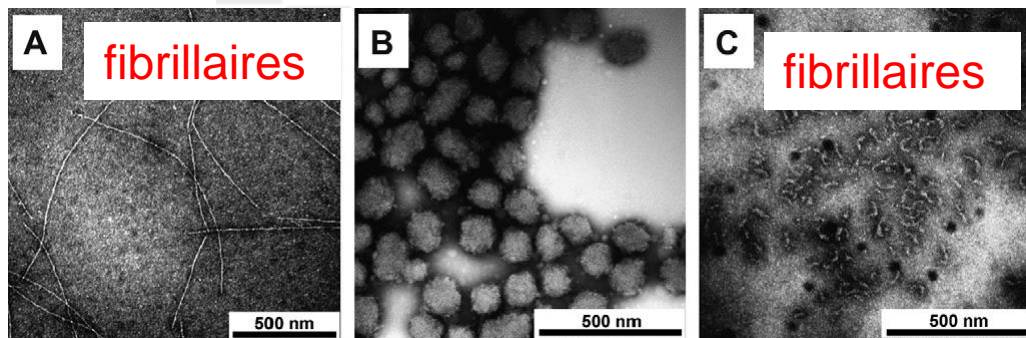
Microsphères

- ❑  $C < C_{gel}$  : structures dispersées en solution
- ❑ **Activation** des protéines (dénaturation)
  - $T > T_{dén}$ , pH extrêmes (ph acides – hydrolyse)
- ❑ Agrégation suivant un mécanisme de nucléation/croissance/terminaison
  - Redistribution des liaisons intra et inter-moléculaires
  - irréversible
  - Prédominance des feuillets  $\beta$ -intermoléculaires
- ❑ Consommation de l'ensemble des protéines
- ❑ **Diversité** de structures formées
  - agrégats fractals, structures particulières, structures fibrillaires, rubans, sphérulites
- ❑ Mécanismes d'agrégation **génériques** aux protéines
  - toutes les protéines font des fibres ou des agrégats fractals
  - conditions du milieu influencent la vitesse de déroulement des étapes



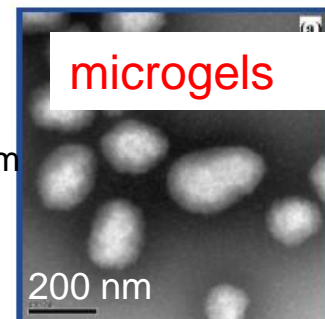
$\beta$ -lg 10g/l (Jung et al. 2008)

pH2 (90°/300min) : brins longs rigides      pH 5.8 (85°C/15min) : sphères      pH 7.0 (85°C/15min) : brins allongés courbés

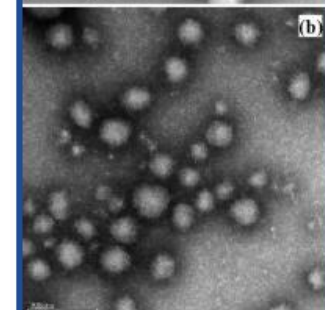


$\beta$ -lg 10g/l chauffage 85°C/15 min (Schmitt et al. 2009)

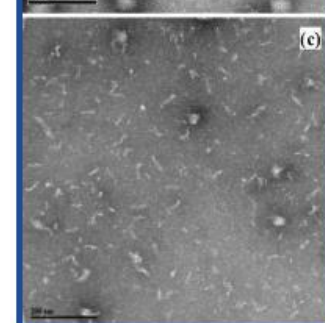
pH4.6 :  
sphériques  
(microgels)  
 $100 < \phi_H < 400$  nm



pH5.8 :  
sphériques  
(microgels)  
 $50 < \phi_H < 100$  nm



pH7.0 :  
assemblages  
linéaires de  
longueur très  
hétérogène

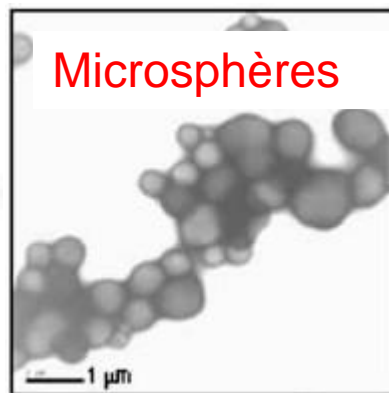
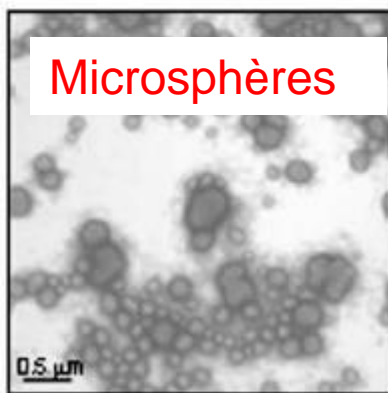
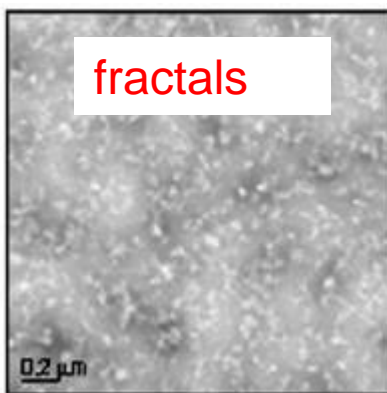


$\beta$ -lg 10g/l et chauffage 85°C - 1h (Donato et al. 2009)

pH 7.0 : assemblages  
fractals  
 $50 < \phi_H < 200$  nm

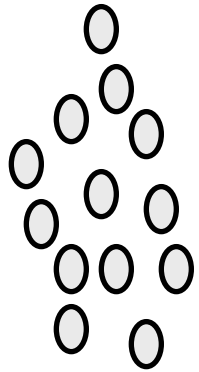
pH 5.9 : sphères  
 $50 < \phi_H < 500$  nm

pH 5.7 : sphères  
 $200 < \phi_H < 1000$  nm

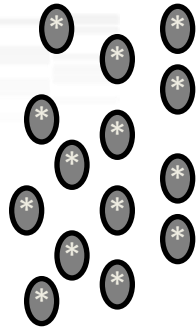


# Structures particulières

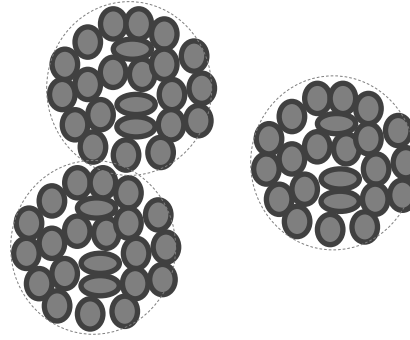
→ Condition de faible répulsion entre protéines ( $\text{pH} \sim \text{pI}$ , force ionique élevée)



1



2



Monomères natifs

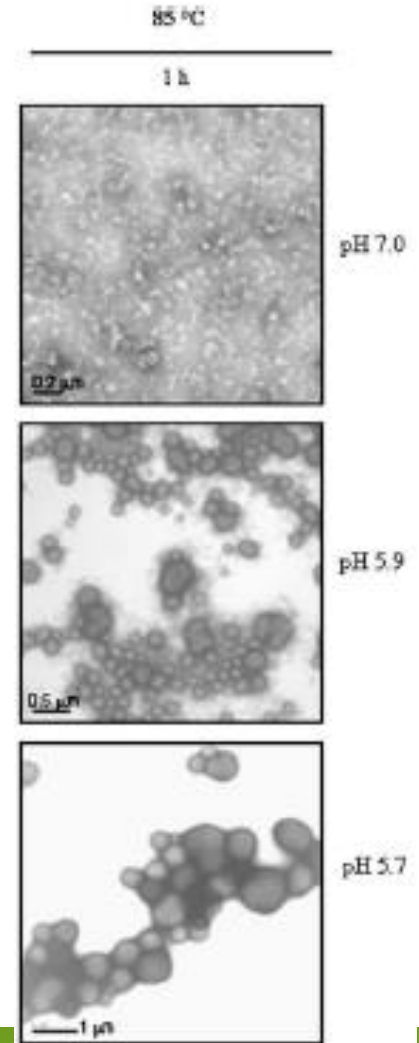
Monomères réactifs

Nanoparticules  
(agrégées ou isolées)

$\text{pH} = \text{pI}$

$\text{pH} \neq \text{pI}$

1 – Activation  
2 – Agrégation

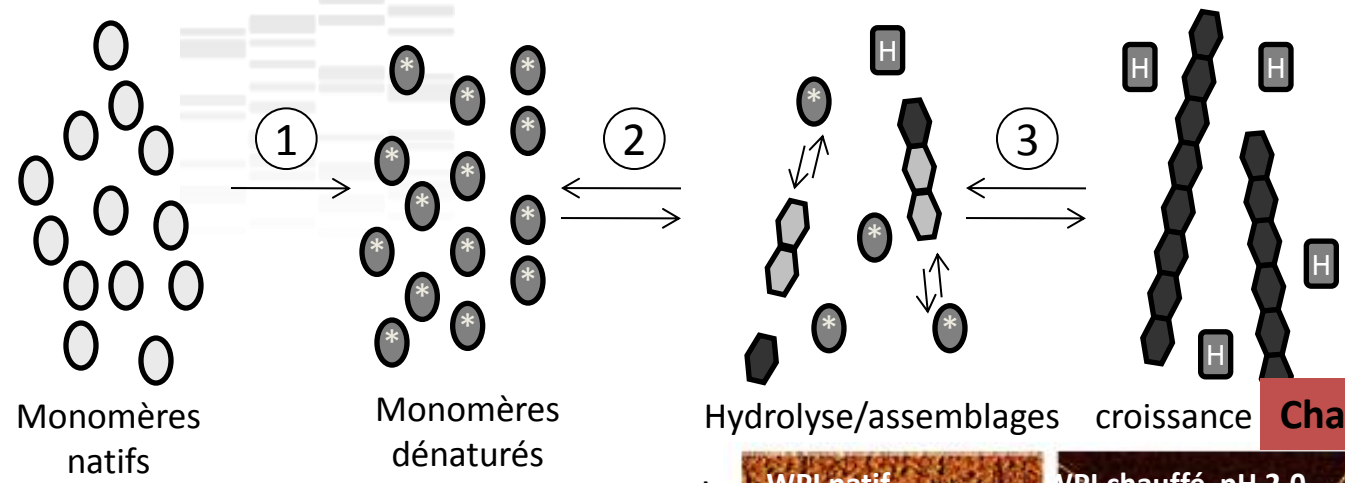


Donato et al. (2009)

.018

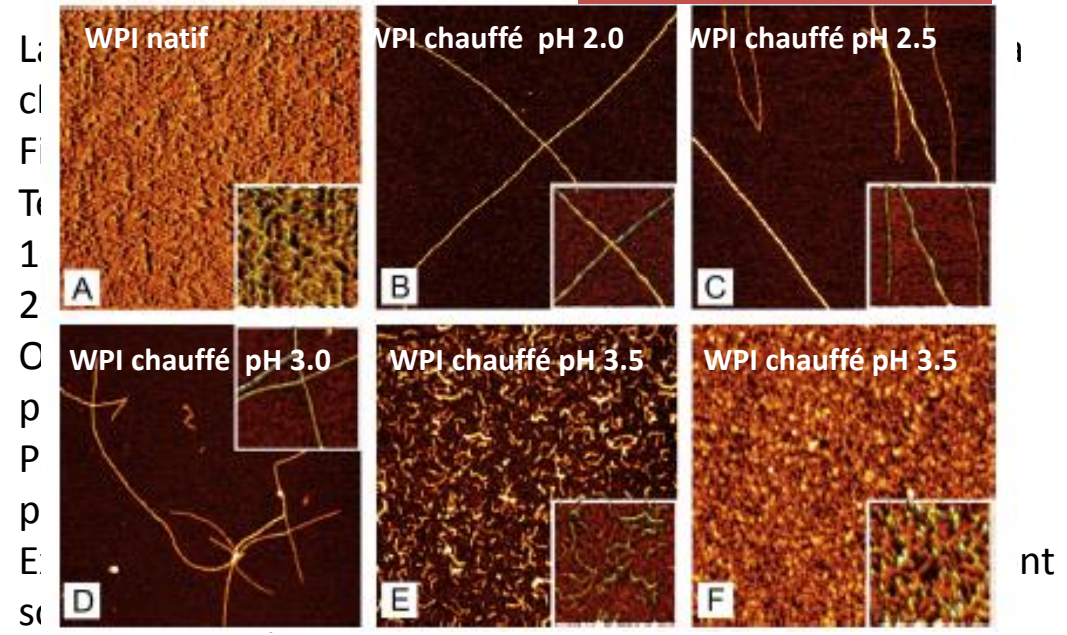
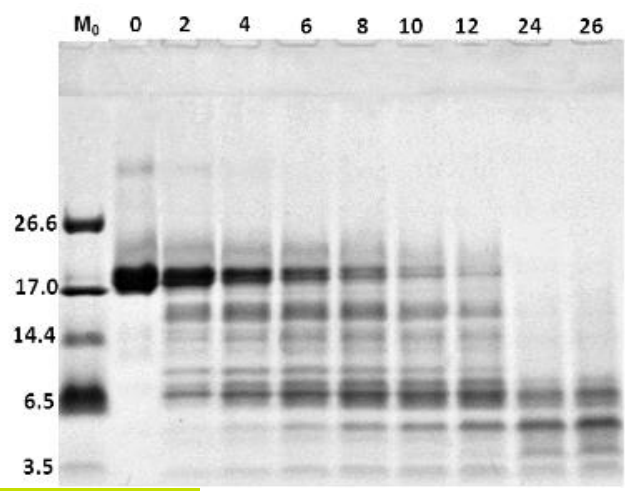
# Structures fibrillaires

→ Condition de forte répulsion entre protéines (pH 2-3)



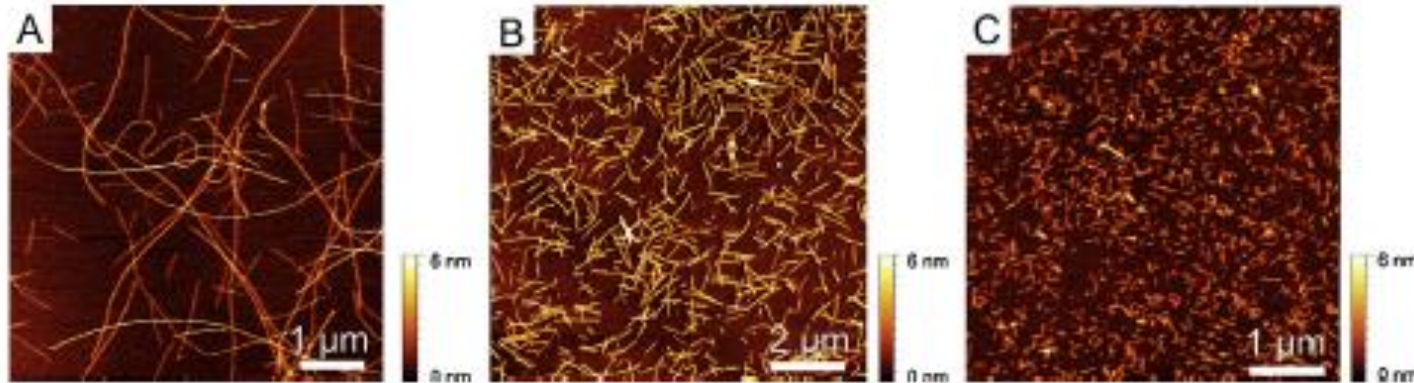
**Chauffage à 90°C/5h**

< 40% des protéines ( $\beta$ -lg) dans les fibres !



Serfert et al. 2014 *J. Food Eng.* 143

- Effets force ionique, cisaillement, réduction, etc.



après cisaillement dans  
un rotor/stator

puis homogénéisation

Serfert et al. 2014 *J. Food Eng.* 143

- Fibrils de WPI sont placées à l'interface huile- water (o/w)
- Films plus élastiques que WPI natif
- Amélioration de l'activité émulsifiante par rapport à WPI natif
- Amélioration de l'efficacité de micro-encapsulation

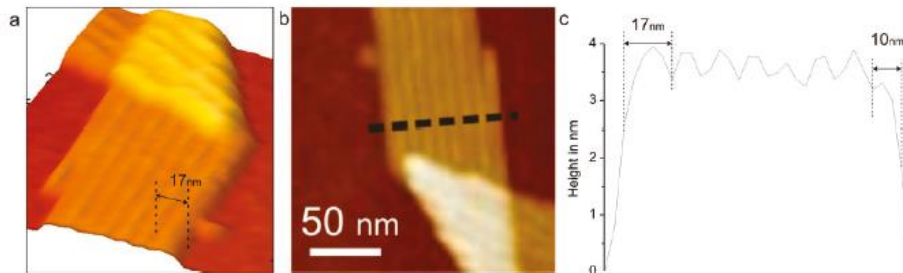
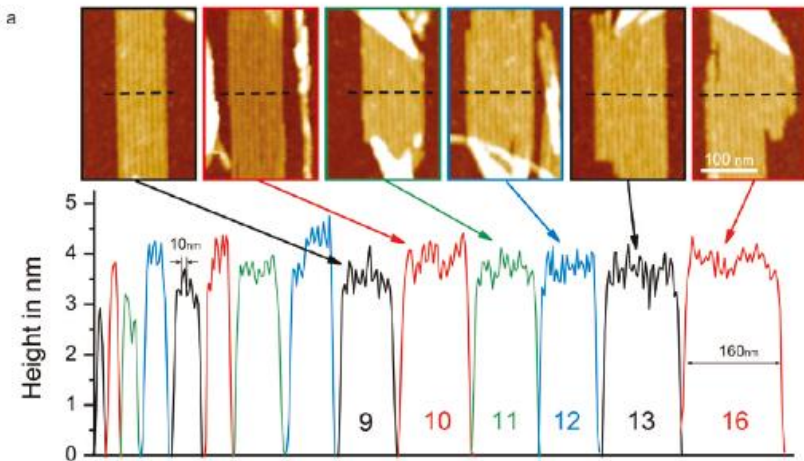
**Dans certaines conditions, fibrilles peuvent s'assembler en sphérulites ou rubans**

# Structures en rubans

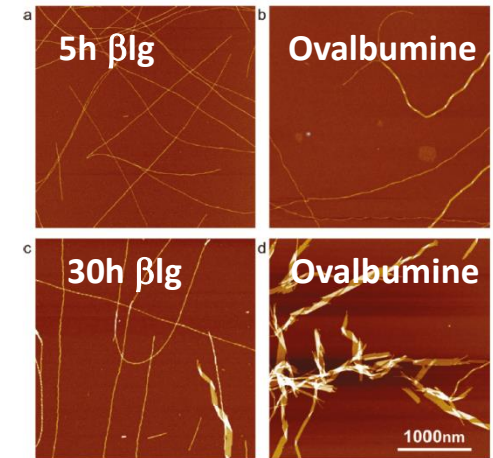
*Lara et al. 2011 Biomacromol., 12, 1868*

Ovalbumine ou  $\beta$ lg 20 g/L pH 2 à 90°C sous agitation 300 rpm pendant 100 heures  
 On obtient des filaments dont la largeur augmente avec le temps de chauffage, tel qu'observés en AFM  
 Teneur en hélice diminue dès 3 h et à 6h  
 Et contenu en structure dépliée augmente (cad à 200 nm)  
 Hydrolyse est très rapide : dès 3h de chauffage peu de  $\beta$ lg résiduelle. Puis persistent 3 fragments de taille < 6 kDa

AFM – les fibrils vus en AFM, 1 filament = 10nm de large et 4.2 nm de hauteur



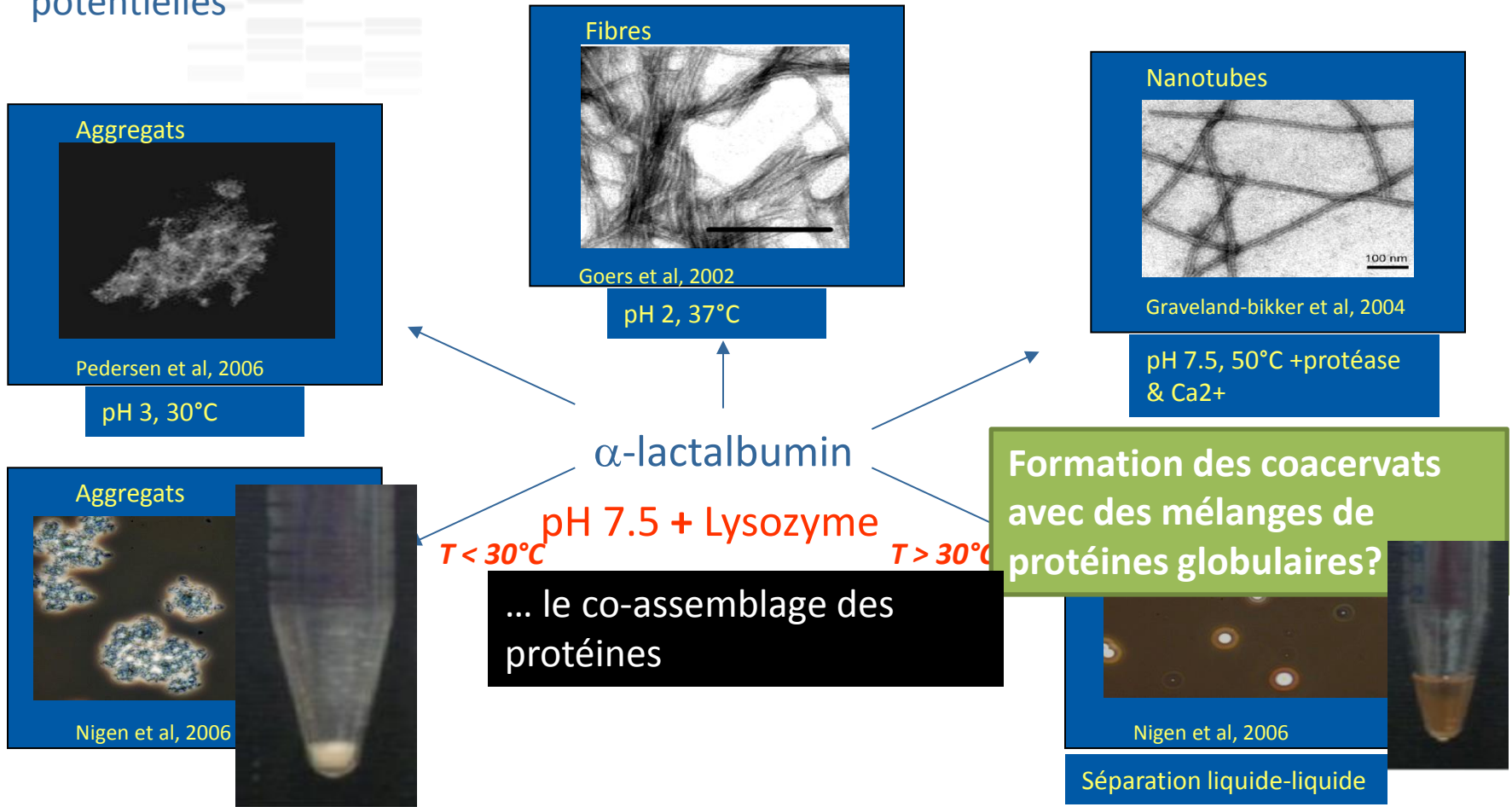
**Figure 5.** AFM height and width profile of an HEWL ribbon. (a) AFM 3D image of a ribbon composed of 8 + 1 filaments (8 resolved and one arising from the larger 17 nm wide edge filament). (b) AFM height image of the same ribbon. (c) Height profile of the ribbon shown in parts a and b. The profile is acquired along the dashed line shown in part b.



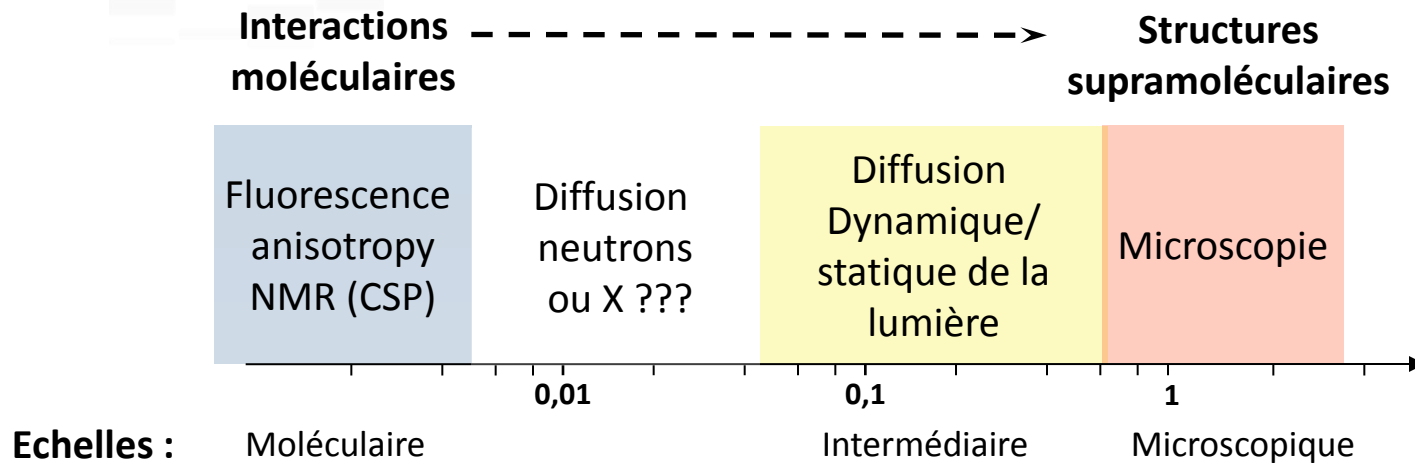


# Assemblages spontanés

Mécanismes de formation des coacervats entre protéines globulaires et applications potentielles



## □ Compréhension des mécanismes de formation des coacervats dans des systèmes de protéines mélangées : approche multi échelle

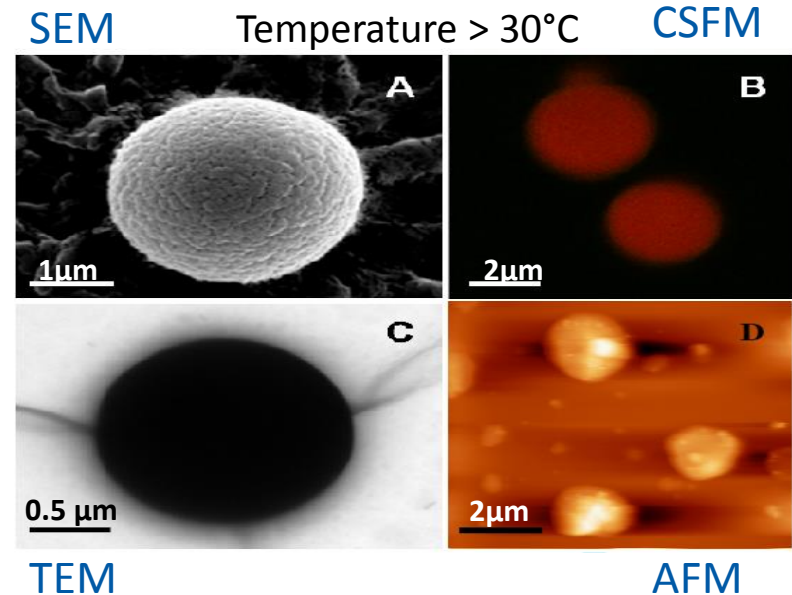




# Investigation à l'échelle microscopique

## Lysosyme + apo- $\alpha$ -lactalbumine (2007)

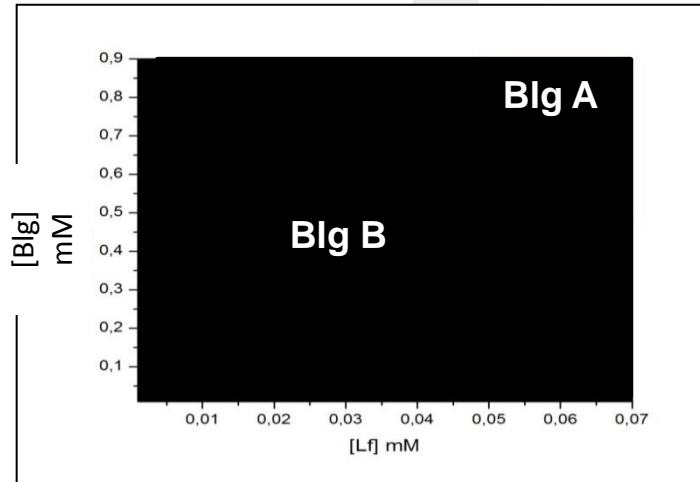
- ❑ Coacervats de lysosyme and d'apo- $\alpha$ lac (1 - 5  $\mu$ m)
- ❑ Equimolarité des protéines dans les coacervats
- ❑ Co-localization des protéines dans les coacervats (expérience de FRET)



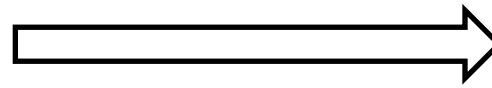
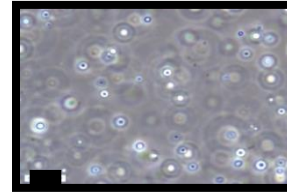
*Nigen, M. et al. FEBS Journal, 2007*

# $\beta$ lactoglobuline + lactoferrine (2014)

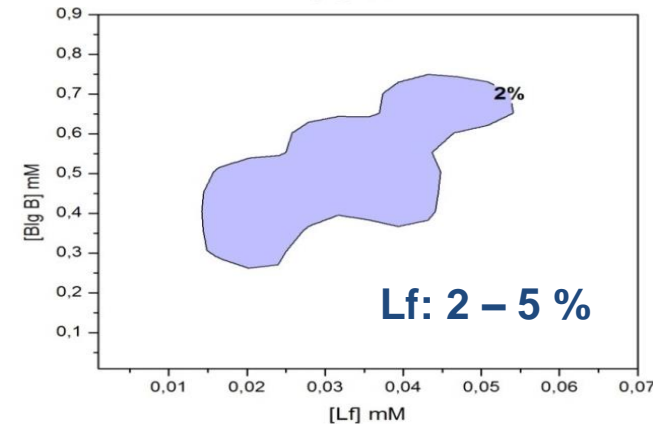
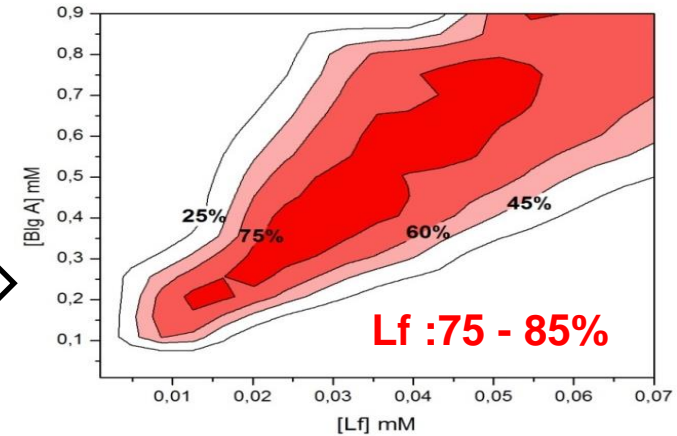
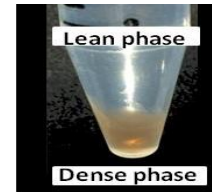
Concentration en protéines  
Ratio molaire



pH 5.5



Teneur en  
Lactoferrine



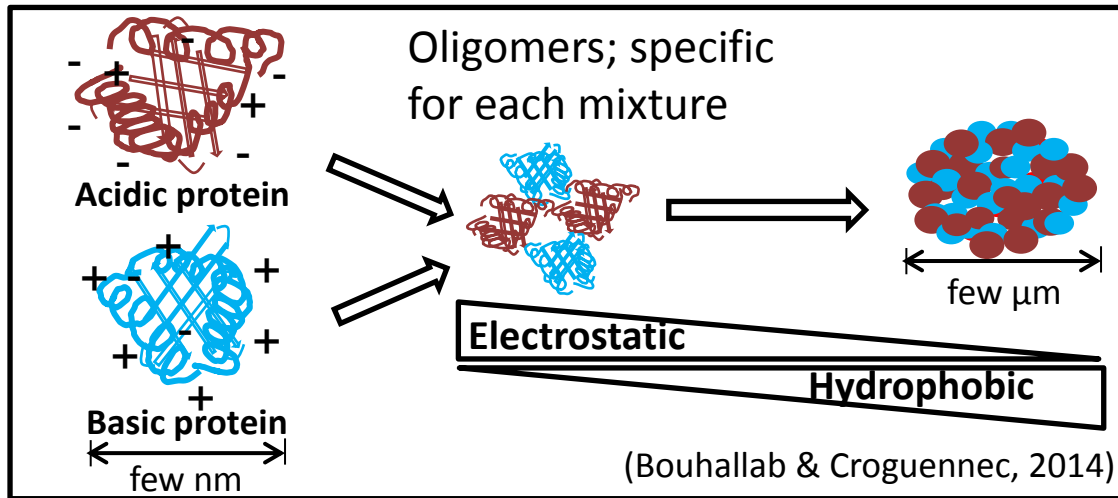
- pour la  $\beta$ lg B : zone de formation des coacervats est plus restreinte

- pour la  $\beta$ lg B : faible teneur en lactoferrine dans les coacervats

Ratio :  $\beta$ lg/Lf : 4-8/1 (mais d'autres études montrent d'autres ratios) avec présence de  $\beta$ lg (monomère + dimères)

Plus complexe que lysosyme-apolactalbumine

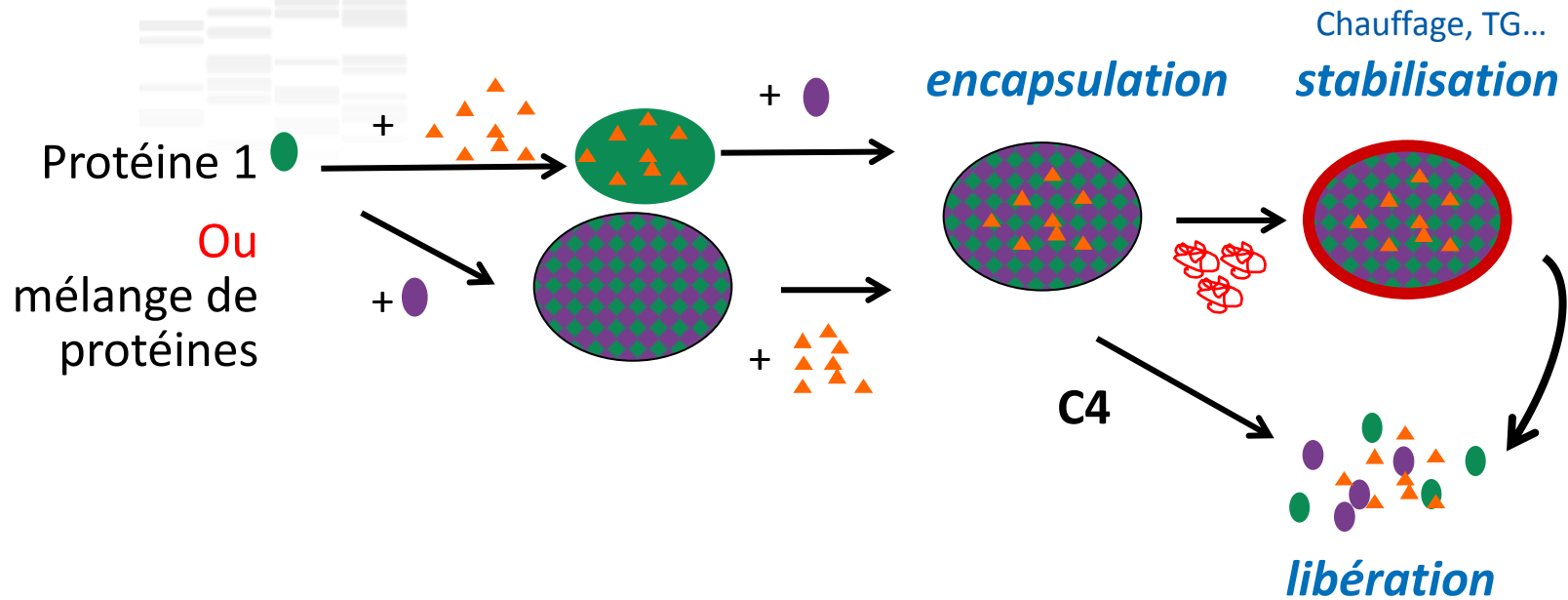
- ❑ Co-assemblage de protéines de charges opposées dans les coacervats
- ❑ **Processus universel**



qui dépend de :

- **pH**, force ionique, température;
- **concentrations en protéines** et ratio molaire entre les 2 partenaires (charge and size);
- **Conformation protéiques, structure primaire**

# Application potentielle : protection /vectorisation de molécules d'intérêt

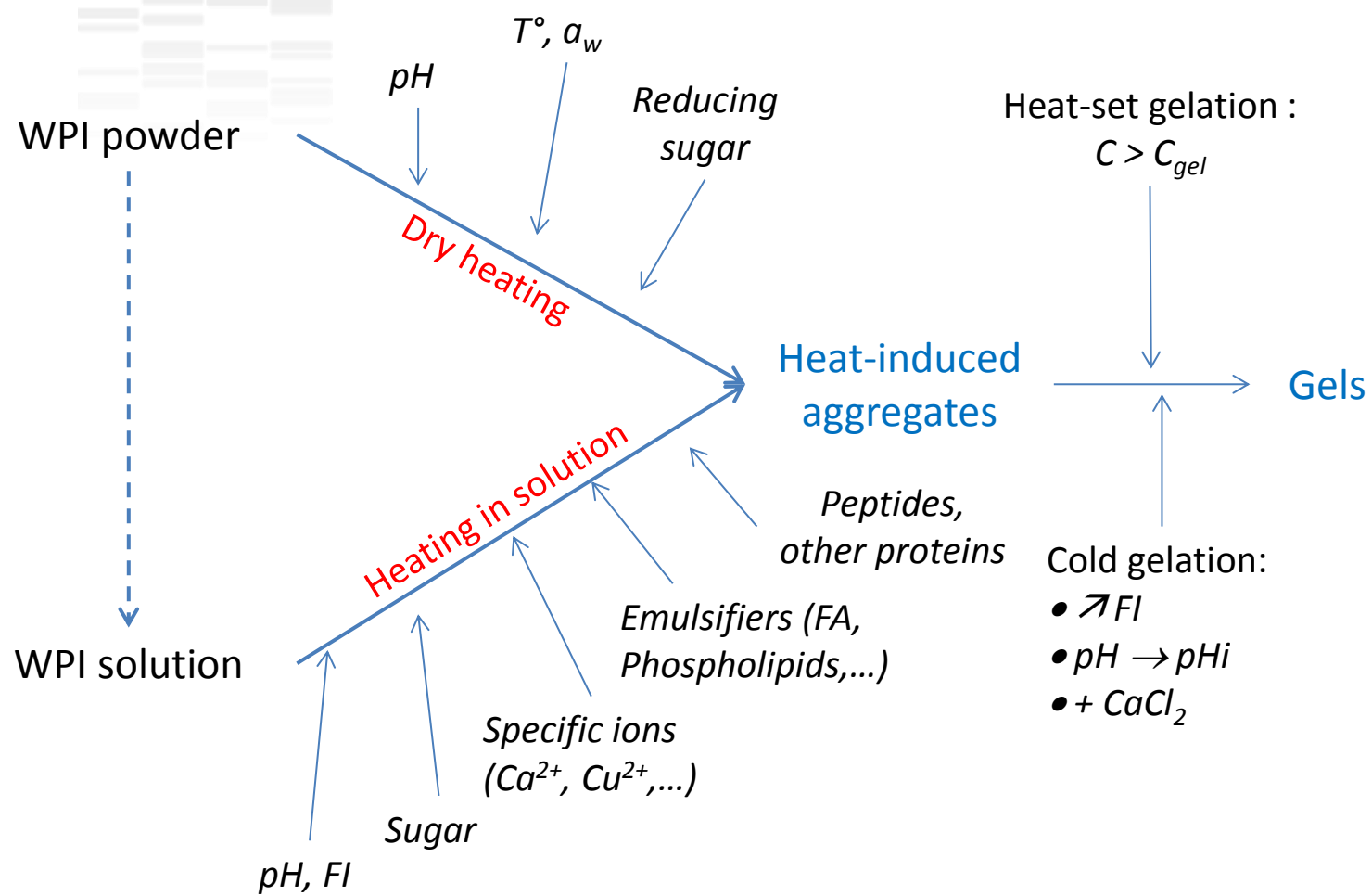


Problème de la stabilité et stabilisation/libération?

Par exemple travaux dans le cadre du projet interrégional Profil

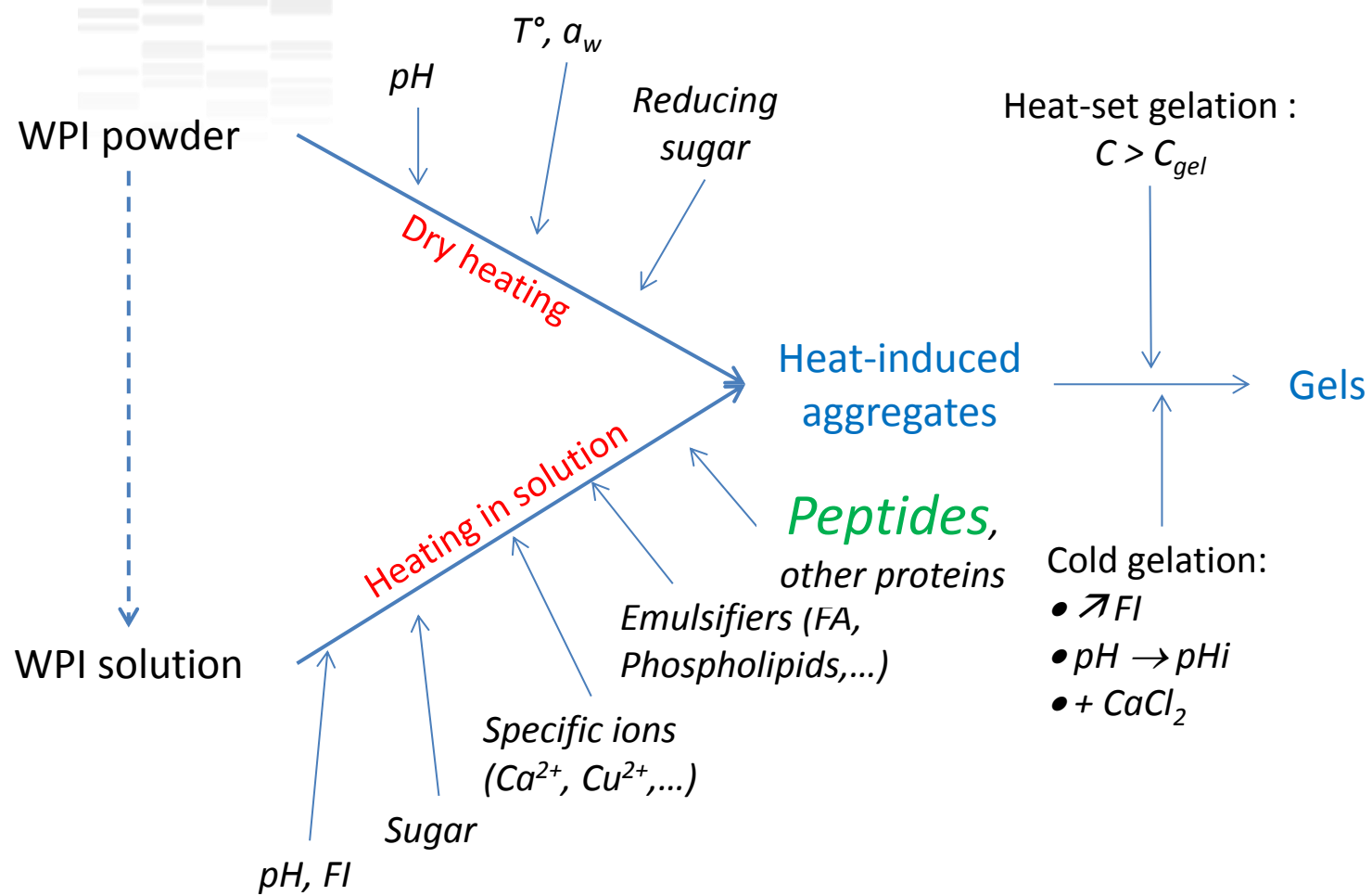
# Various means for obtaining whey protein aggregates and gels

Structure and properties of the aggregates and gels depend on the way used for their formation

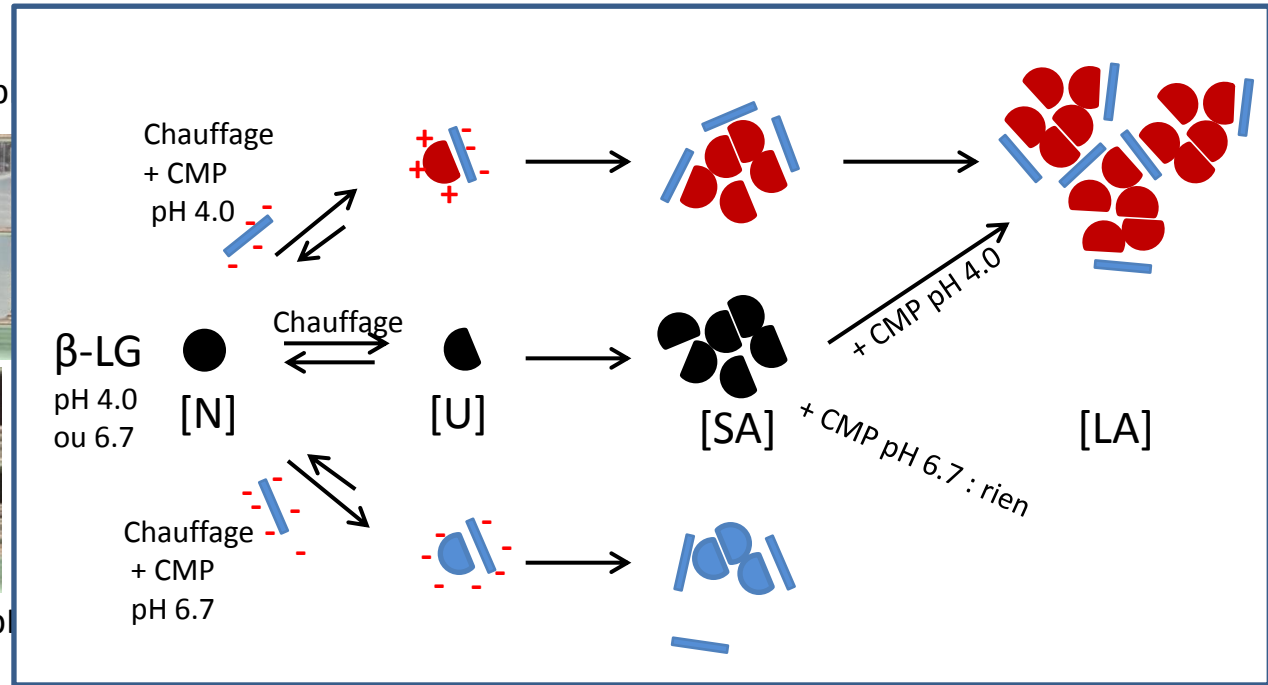
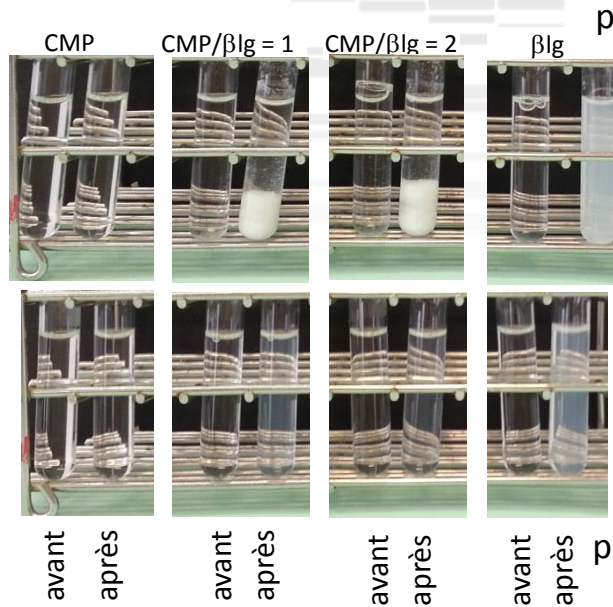


# Various means for obtaining whey protein aggregates and gels

Structure and properties of the aggregates and gels depend on the way used for their formation



# Influence of CMP

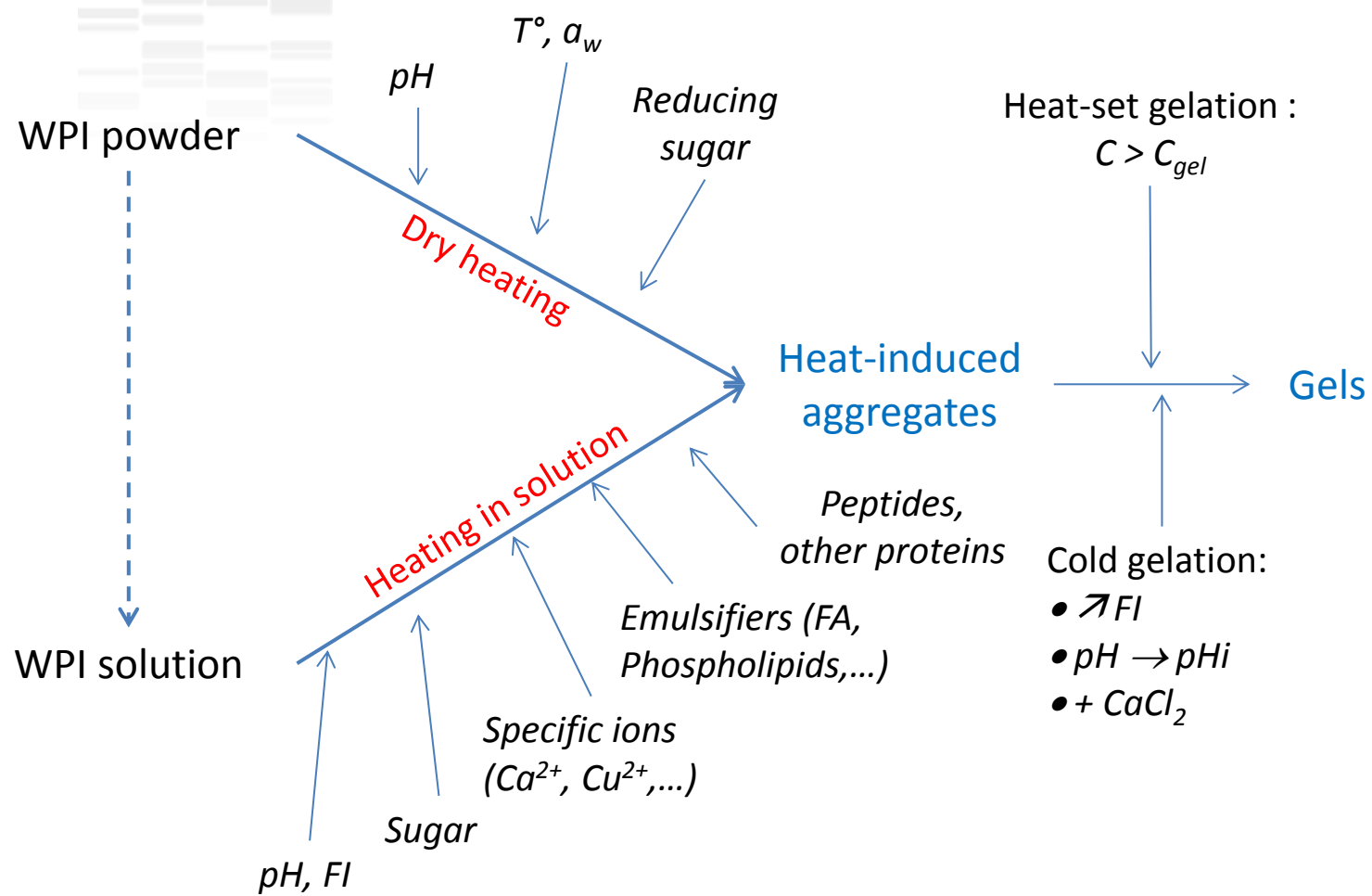


βlg et les agrégats sont plus gros et forment un précipité

- À pH 4, l'addition de CMP à de la βlg chauffée seule a conduit à une augmentation de turbidité et une séparation de phase – pas à pH 4.7
- A pH 4, les 2 sont de charges opposées et interagissent – gros agrégats
- A pH 6.7, ils sont tous les 2 de charges négative – effet chaperone

# Various means for obtaining whey protein aggregates and gels

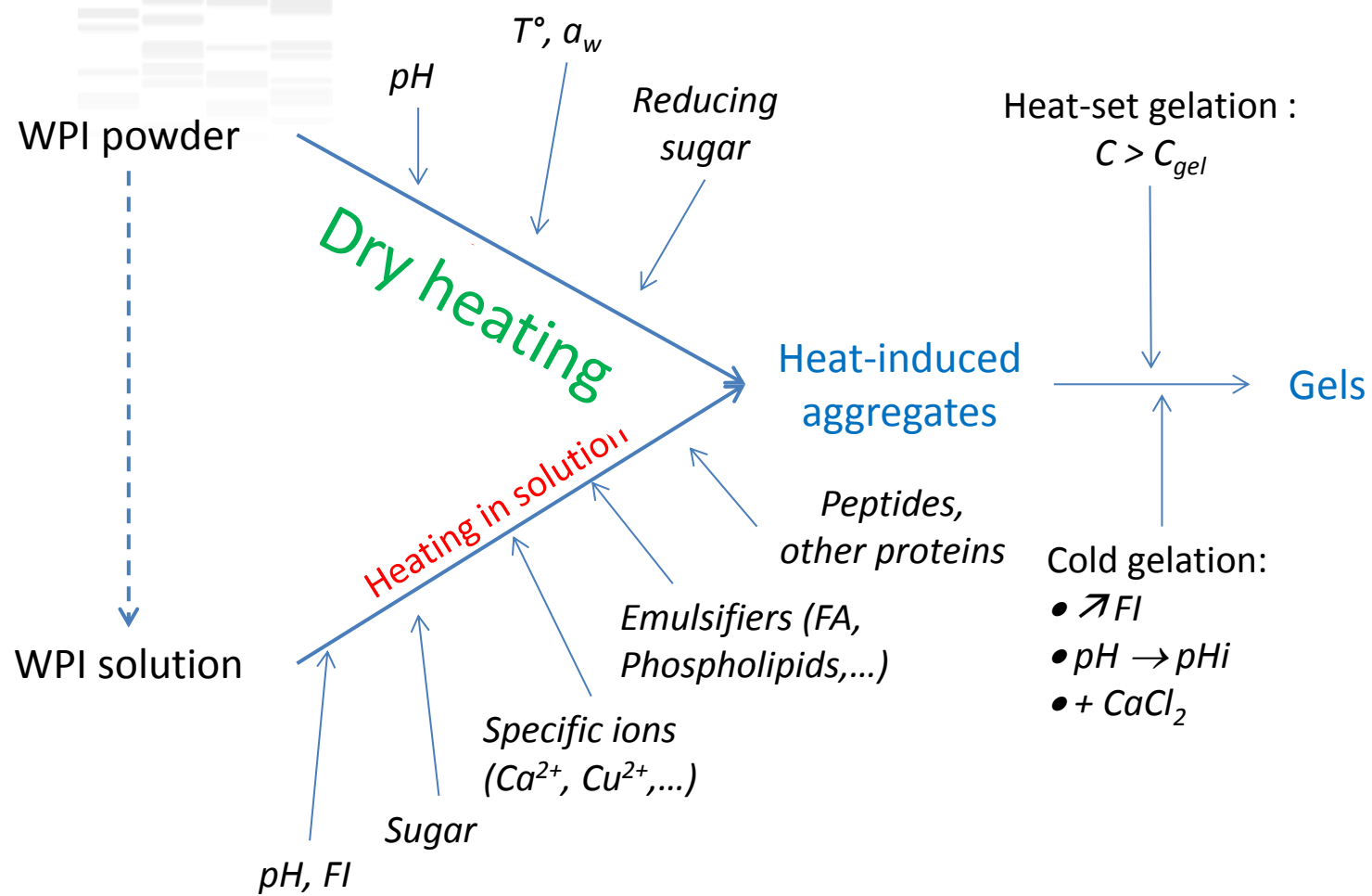
Structure and properties of the aggregates and gels depend on the way used for their formation





# Various means for obtaining whey protein aggregates and gels

Structure and properties of the aggregates and gels depend on the way used for their formation



# Dénaturation/agrégation des protéines sériques par étuvage

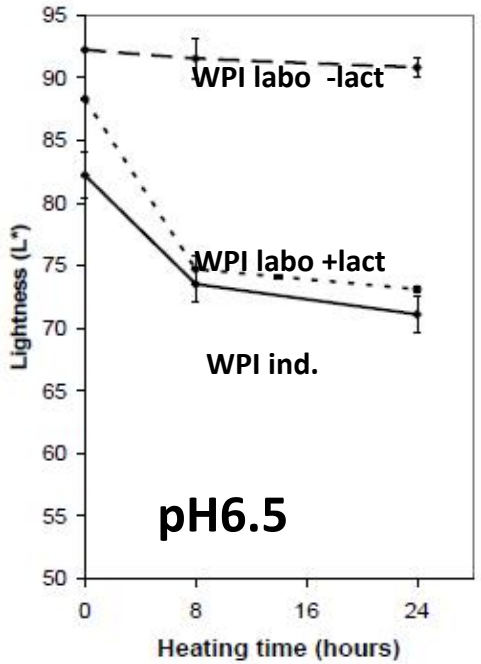
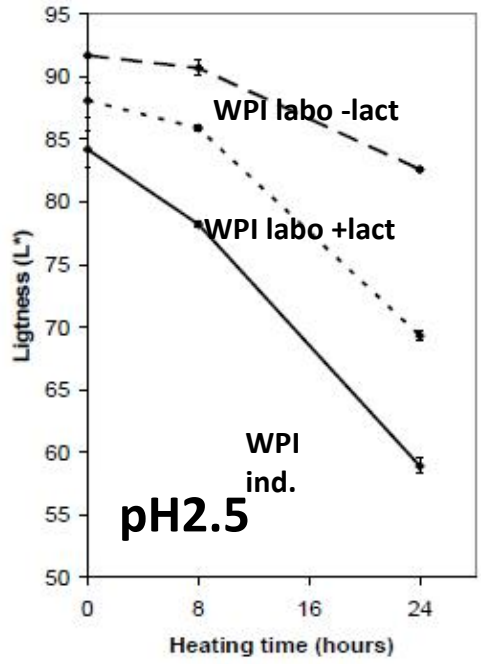
- Paramètres : température – temps – activité d'eau – pH



WPI ind. WPI labo - lactose WPI labo + lactose



WPI ind. WPI labo - lactose WPI labo + lactose



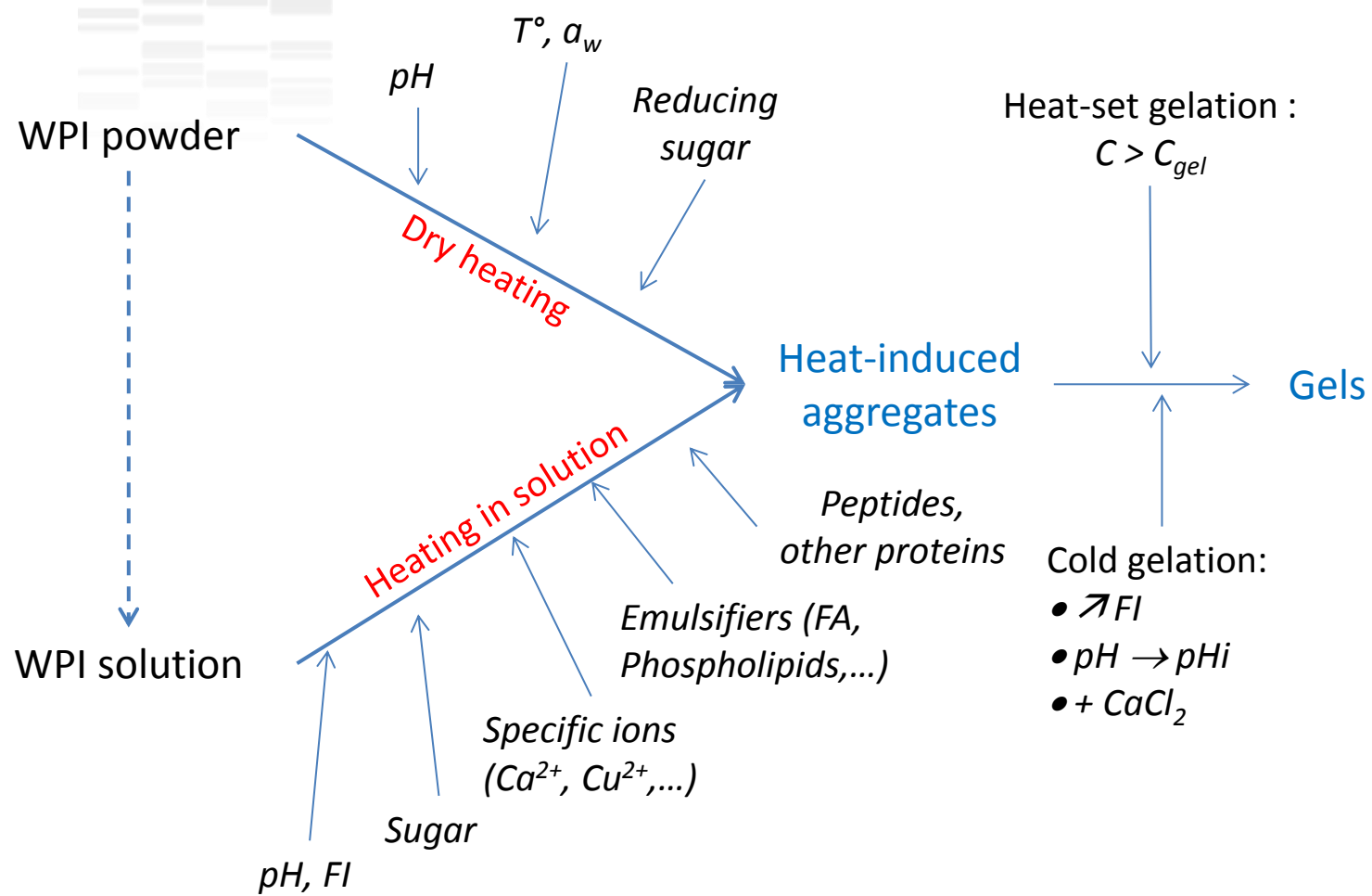
agrégation

ent des SS, à pH 4.5 et 6.5 autres liaisons

- Autres modifications comme des cyclisations d'acides aminés
- La présence de lactose augmente la dénaturation/agrégation
- Formation de petits agrégats solubles et agrégats plus gros et non-solubles
- Aptitude à thermo-gélfication est favorisée par la présence de petits et gros agrégats
- Trop de gros agrégats non-solubles est défavorable à la thermo-gélfication

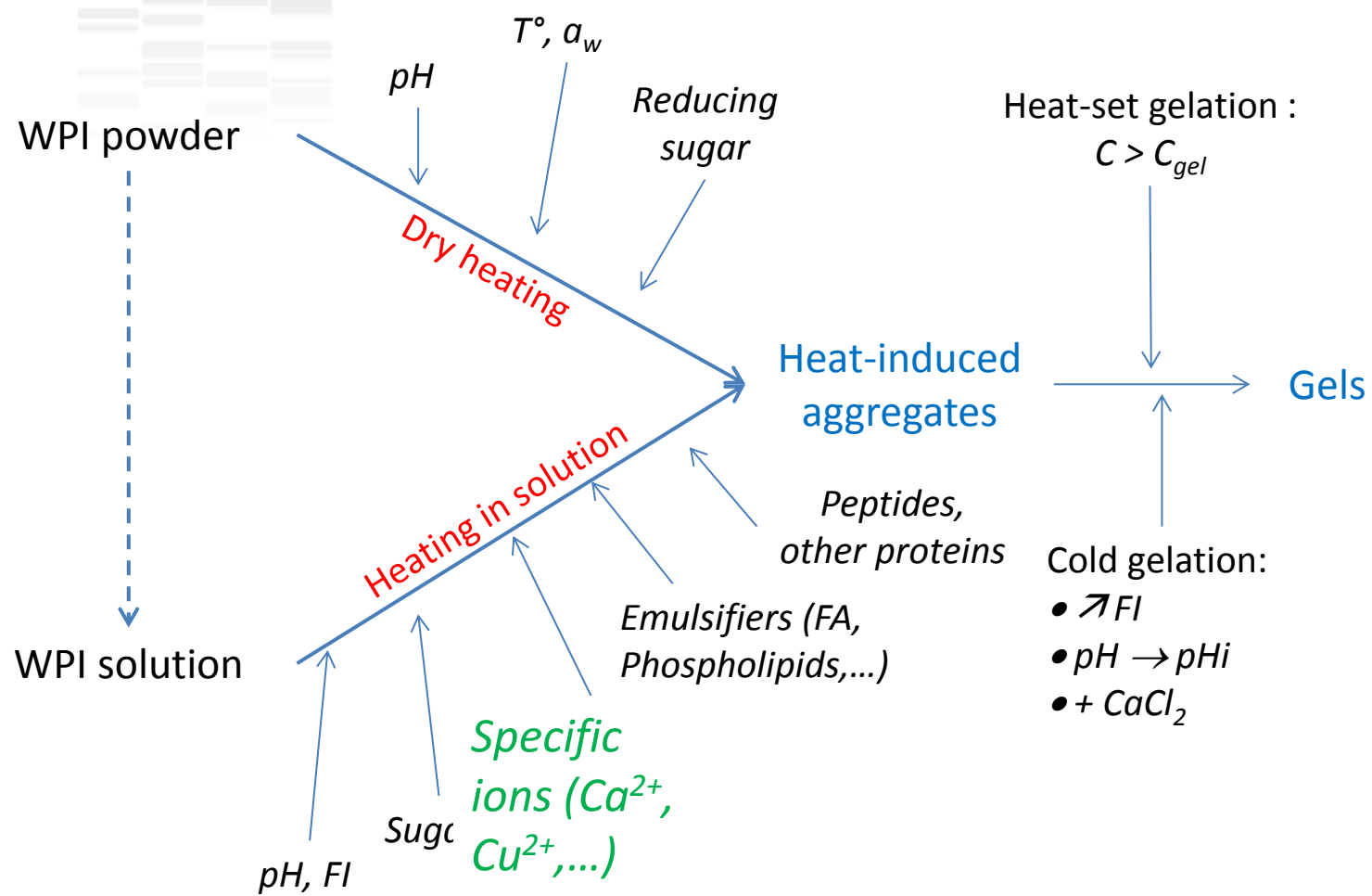
# Various means for obtaining whey protein aggregates and gels

Structure and properties of the aggregates and gels depend on the way used for their formation



# Various means for obtaining whey protein aggregates and gels

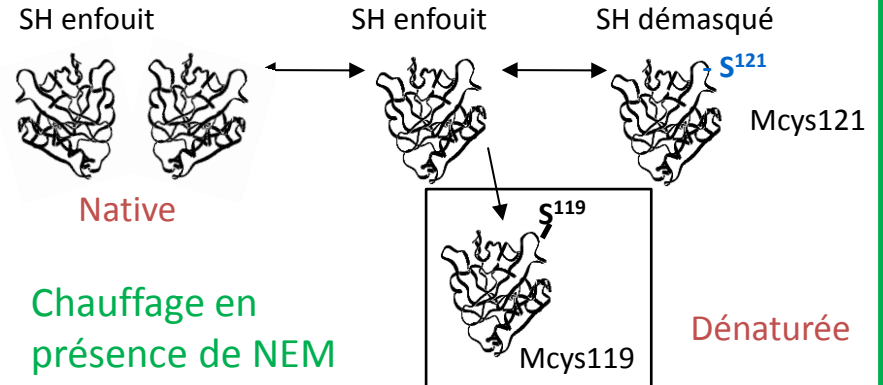
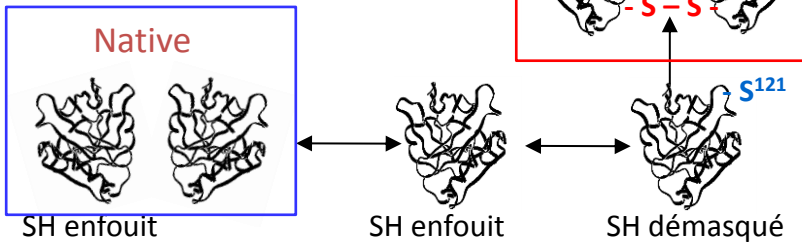
Structure and properties of the aggregates and gels depend on the way used for their formation



# Propriétés interfaciales

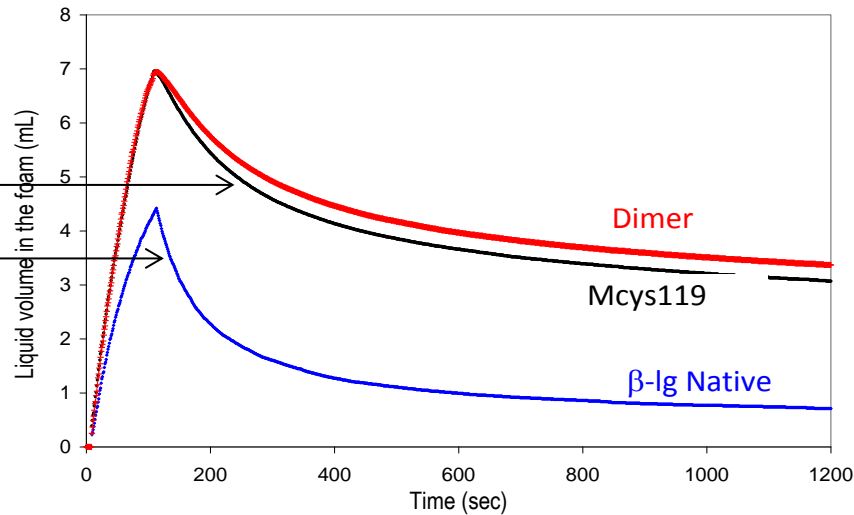
## Structure non native vs $\beta$ -lg native

Chauffage en présence de  $Cu^{++}$

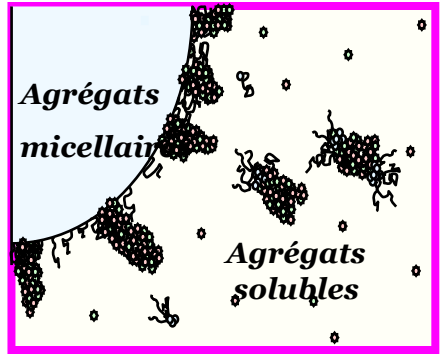
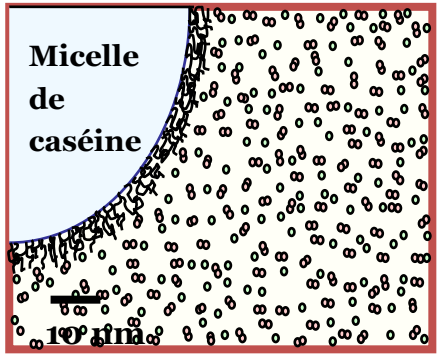
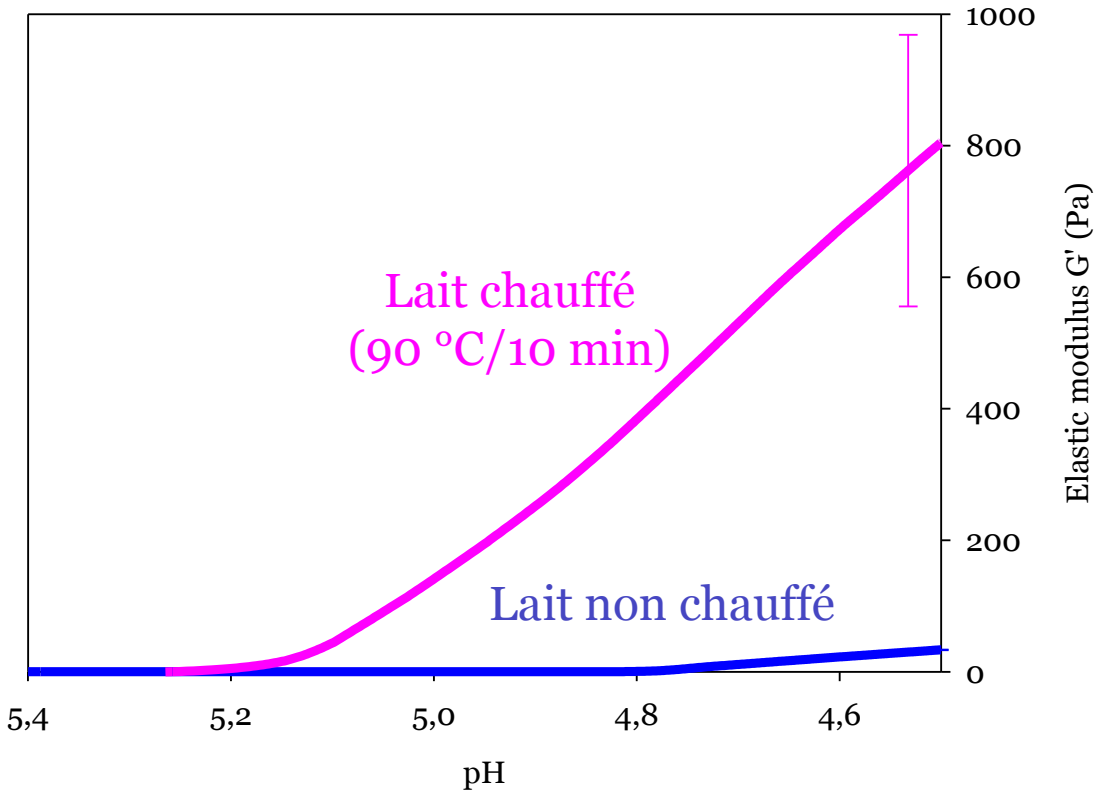


Mousse fine, stable

Mousse avec des grosses bulles instable



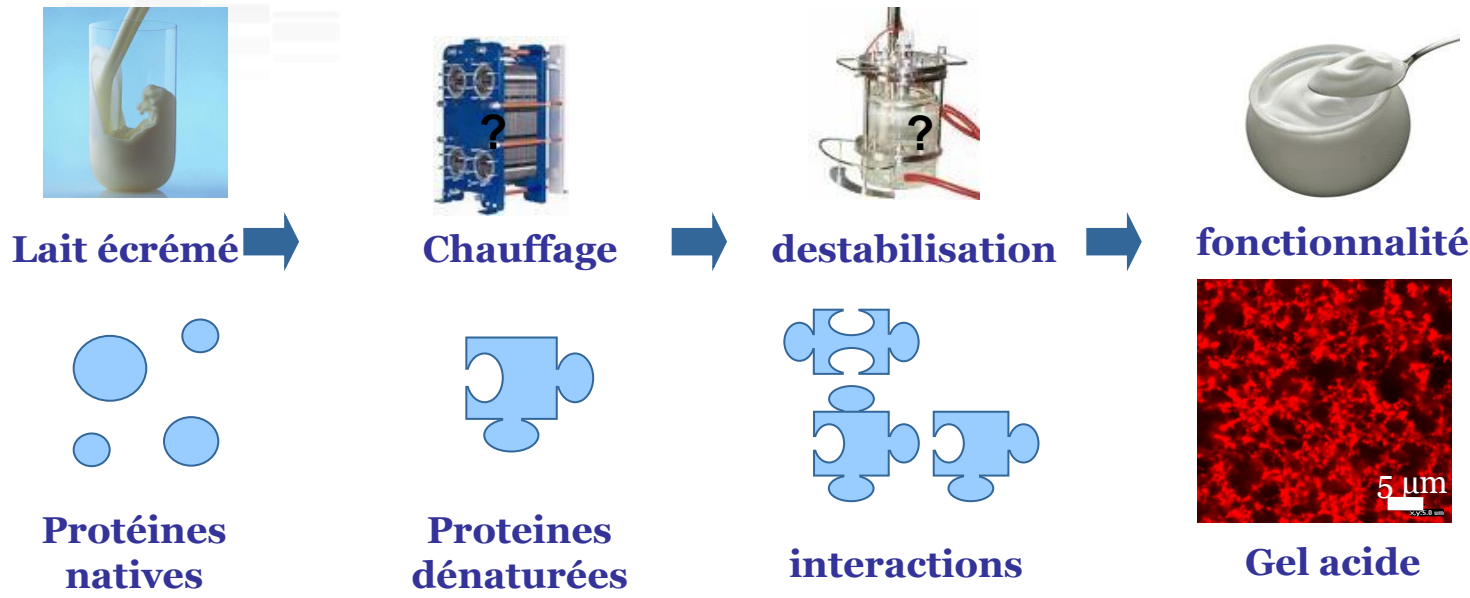
# Modification des agrégats de protéines sériques



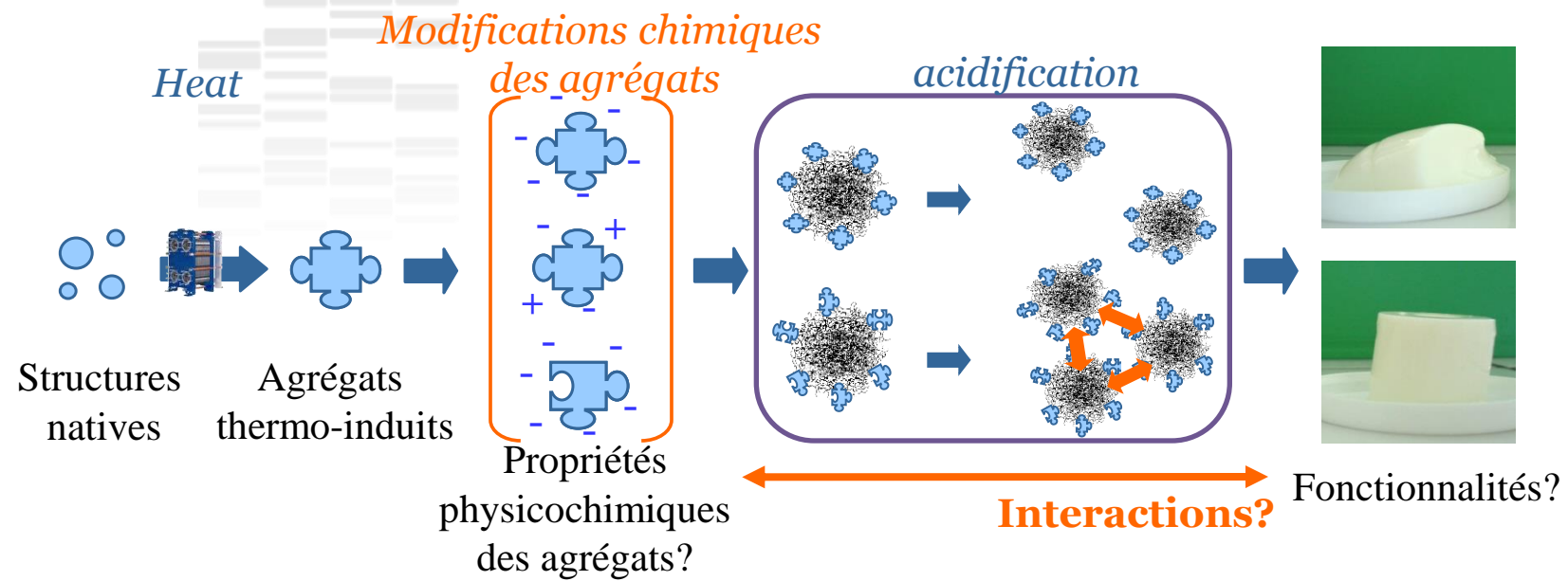
Le pH de gélification acide et la fermeté du gel acide augmente suite à la formation des agrégats thermo-induits (Lucey et al., 1997, 1998 ; ...).

# Modification des agrégats de protéines sériques

## Fabrication schématique des yaourts



# Stratégie



OBJ1 : Propriétés des agrégats thermo-induits ↔ fonctionnalités dans les gels acides de lait

OBJ2 : Identifier les interactions AG-AG , AG-MCAS pendant la gélification acide du lait

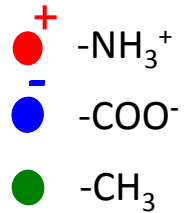
Q1 : Charge des agrégats?

Q2 : Hydrophobie des agrégats?



# Charge des agrégats?

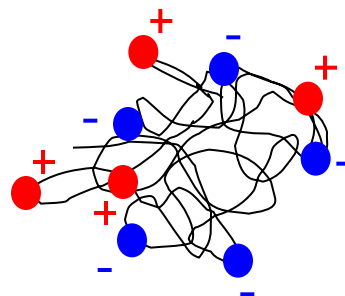
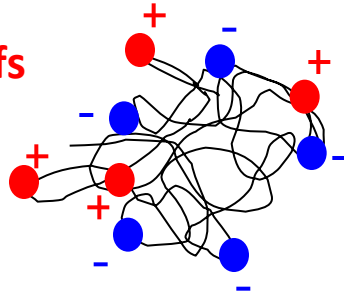
Agrégats de protéines sériques thermo-induits



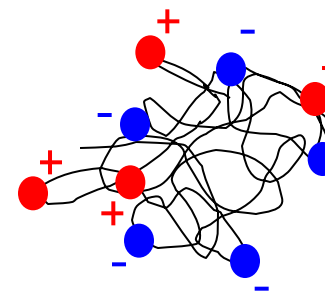
succinylation

méthylation

Plus négatifs



Plus positifs



Propriétés physicochimiques

+ 1.7% GDL, 35°C

+ caséine et phase aqueuse  
+ 1.8% GDL, 35°C

Gel acide de protéines sériques

Gel acide de lait

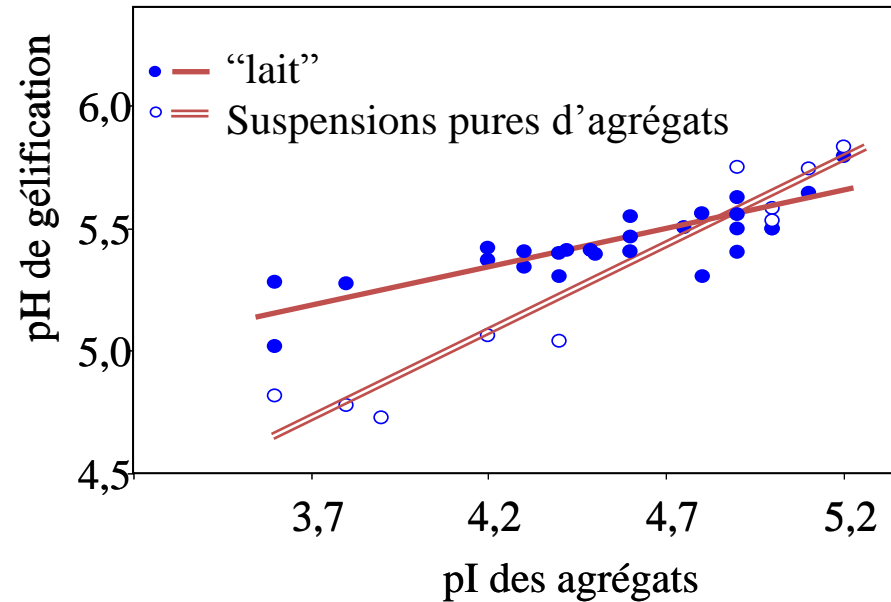
Propriétés fonctionnelles

Modification des agrégats de protéines sériques

.041

# Charge des agrégats?

- pI et charge des agrégats → pH de gélification de suspensions pures d'agrégats
- Pas d'effet sur fermeté des gels

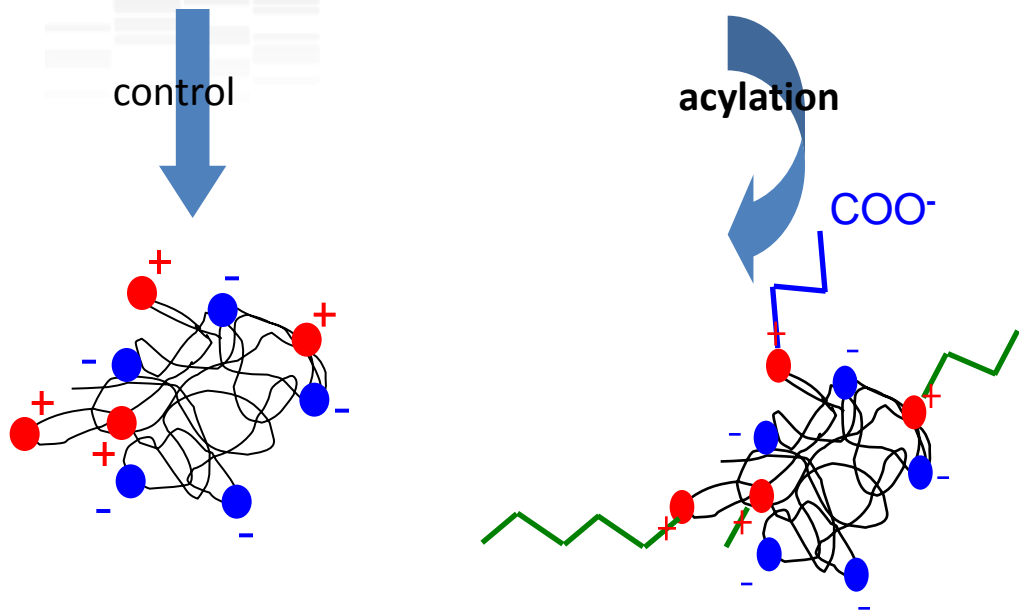


- pI et charge des agrégats → pH de gélification des suspensions micelles + agrégats
- 80% de micelles de caséine + 20% d'agrégats : les agrégats imposent leur propriétés aux mélanges
- Pas d'effet sur fermeté des gels

**Réduction des répulsions électrostatiques permet l'établissement d'interactions attractives. Interactions hydrophobes?**

# Hydrophobie des agrégats?

Agrégats de protéines sériques thermo-induits



**+**  
● -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>  
**-**  
● -COO<sup>-</sup>

**Acylation**  
Anhydride acetic +C2  
Anhydride butanoic +C4  
Anhydride hexanoic +C6

**succinylation**  
Anhydride succinic +C4<sup>-</sup>

**Propriétés physicochimiques**

+ 1.7% GDL, 35°C → **Gel acide de protéines sériques**

+ caséine et phase aqueuse + 1.9% GDL, 25°C → **Gel acide de lait**

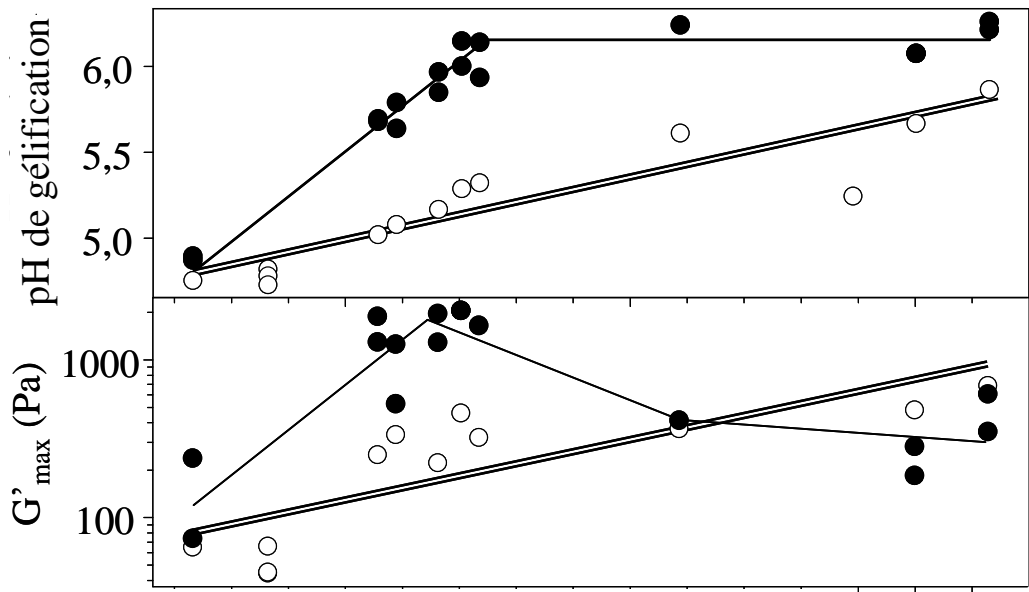
**Propriétés fonctionnelles**

# Hydrophobie des agrégats?

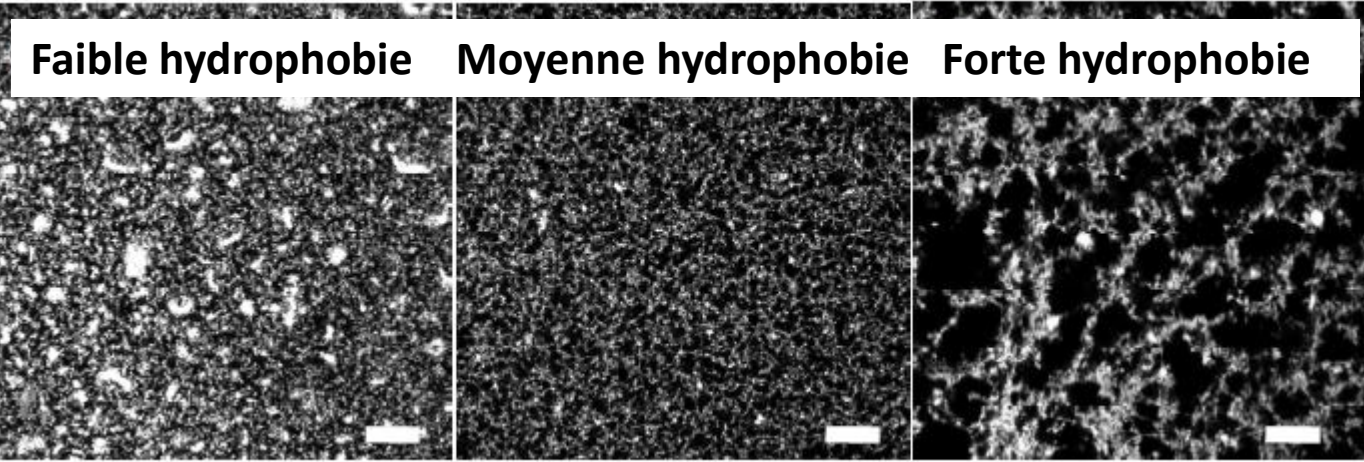
$D_h = cte \sim 100 \text{ nm}$   
 $pI = cte \sim 3.7$

● — “lait”  
 ○ = Suspensions pures d’agrégats

- ↗ hydrophobie → ↗ pH gélification agrégats purs
- ↗ hydrophobie → ↗ fermeté gels d’agrégats purs
- ↗ hydrophobie → ↗ pH de gélification des suspensions micelles + agrégats
- ↗ hydrophobie modérée → ↗ fermeté gels d’agrégats purs
- Trop forte synérèse et



15000



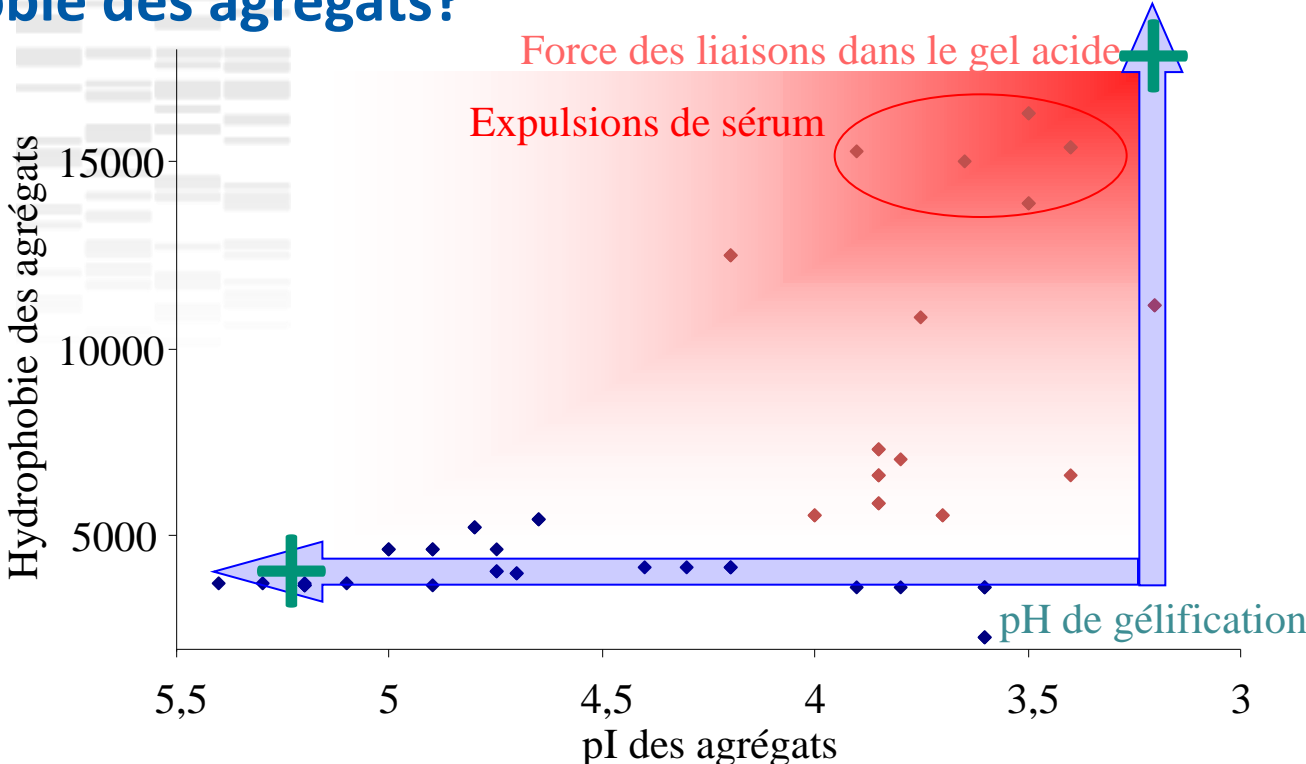
80% de mic mélanges :

Interaction acides de l

is aux

els

# Hydrophobie des agrégats?



- le point de gel dépend de l'hydrophobie et de la charge des agrégats -> interactions hydrophobes et électrostatiques - interactions influencent le début de gélification acide du lait
- Force des liaisons = f(hydrophobie des agrégats) -> interactions hydrophobes influencent la construction du gel

# Conclusions/perspectives

- Gels constitués d'agrégats de protéines sériques - caséines
  - ✓ effet de la taille/forme/structure des agrégats : projet PROFIL en cours
  - ✓ rôle des SH et SS?
  - ✓ rôle de la micelle de caséine?
- Design d'agrégats thermo-induits
  - ✓ pour maîtriser les conditions de formation de texture dans les liquides ou de gel (pH de gélification, température, concentrations en sels...)
  - ✓ Pour maîtriser la viscosité des liquides ou la fermeté des matrices.
- Mais, nécessité de mettre en œuvre des méthodes alimentaires?
- Moyens sur le projet PROFIL : **Assemblages PROtéiques multi-Fonctionnels pour l'Innovation en industrie Laitière**
- Autres moyens de produire des agrégats de protéines?
  - ✓ transglutaminase,
  - ✓ chauffage à sec,
  - ✓ Protéines globulaires d'autres origines : plantes, insectes, algues...?
- Milieu alimentaire plus complexe que les milieux modèles
  - ✓ présence d'autres molécules en possible interaction : sucres, sels...
  - ✓ chauffage
  - ✓ Stockage → conservation



***Merci de votre attention***