

GUYLAINE LEMAY

**ÉTUDE DE LA STABILITÉ THERMIQUE DES PROTÉINES DE LACTOSÉRUM
ET DE LEUR COMPORTEMENT EN SOLUTION,
EN PRÉSENCE DE DIVERS DEXTRANS**

Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Département de sciences des aliments et de nutrition
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE
ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL

DÉCEMBRE 2000

© Guylaine Lemay, 2000



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56761-3

Canada

RÉSUMÉ

La stabilité thermique d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL) a été étudiée par calorimétrie différentielle à balayage en fonction du ratio protéines-polysaccharides, du pH et de la présence de NaCl. L'ajout de dextran sulfate semble avoir un effet protecteur sur l'IPL, en élevant sa température de dénaturation de plusieurs degrés Celsius. L'ajout de NaCl a un effet similaire mais l'ajout simultané de NaCl et de dextran sulfate n'apporte pas d'effet protecteur additionnel. L'élaboration des diagrammes de phases des systèmes IPL-dextran sulfaté et neutre a permis de démontrer que les zones d'incompatibilité des diagrammes correspondent généralement à des températures de dénaturation moins élevées en calorimétrie. Lors d'incompatibilité, les interactions entre polymères de même nature sont favorisées, réduisant l'effet protecteur du polysaccharide sur l'IPL. La compréhension du comportement des systèmes protéines-polysaccharides pourrait donc permettre de prédire la stabilité thermique de protéines en solution.

Guyline Lemay
Université Laval, 2000

Sylvie Turgeon
Directrice de thèse

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, le Dr Sylvie Turgeon, pour sa grande disponibilité, son soutien et son professionnalisme. J'estime avoir eu de la chance de pouvoir réaliser ma maîtrise sous sa direction.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de travail pour leurs nombreux conseils et leur support moral indispensable. J'aimerais aussi remercier, Louise Tremblay, Anne-Françoise Allain, Amélie Mercier et Nathalie Martin pour leur grand dynamisme et leur aide précieuse en laboratoire.

Bien sûr, je ne saurais remercier suffisamment ma famille et mon conjoint, Frédéric pour leur support et leur compréhension.

...

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
AVANT PROPOS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTES DES FIGURES	vi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	4
1.1 LES PROTÉINES DE LACTOSÉRUM	5
1.1.1 Introduction.....	5
1.1.2 La composition du lactosérum	6
1.1.3 La β -lactoglobuline	6
1.1.4 L' α -lactalbumine.....	7
1.1.5 La sérum-albumine.....	8
1.1.6 Les immunoglobulines.....	8
1.1.7 Les isolats de protéines de lactosérum.....	8
1.2 SYSTÈMES PROTÉINES-POLYSACCHARIDES	9
1.2.1 Introduction.....	9
1.2.2 Systèmes complexés	10
1.2.3 Systèmes incompatibles.....	12
1.2.4 Les diagrammes de phases	14
1.3 EFFET DE LA CHALEUR SUR LES PROTÉINES DE LACTOSÉRUM	16
1.3.1 Effet de la chaleur sur la conformation des protéines	16
1.3.2 Prédominance de la β -lactoglobuline.....	17
1.3.3 Effet de la conformation des protéines sur l'incompatibilité des systèmes	18
1.3.4 Mesure de la dénaturation des protéines	18
1.4 LA CALORIMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE À BALAYAGE (DSC).....	20
1.4.1 Introduction.....	20
1.4.2 La température de dénaturation	20
1.4.3 L'enthalpie de dénaturation	21
1.5 LE DEXTRAN.....	24
1.5.1 Introduction et historique.....	24
1.5.2 La structure du dextran et de ses dérivés.....	25

CHAPITRE 2 : BUT, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	27
2.1 BUT	28
2.2 HYPOTHÈSE.....	28
2.3 OBJECTIFS.....	28
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE LA STABILITÉ THERMIQUE DES ROTÉINES DE LACTOSÉRUM ET DE LEUR COMPORTEMENT EN SOLUTION, EN PRÉSENCE DE DIVERS DEXTRANS	29
3.1 RÉSUMÉ	30
3.2 INTRODUCTION.....	31
3.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	33
3.3.1 Matériel	33
3.3.2 Préparation des solutions de protéines natives et prétraitées.....	33
3.3.3 Préparation des solutions de polysaccharides.....	34
3.3.4 Préparation des mélanges protéines-polysaccharides	34
3.3.5 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	35
3.3.6 Élaboration des diagrammes de phases.....	35
3.4 RÉSULTATS ET DISCUSSION	36
A) CALORIMÉTRIE.....	36
3.4.1 Températures et enthalpies de dénaturation du système natif	36
3.4.2 Températures et enthalpies de dénaturation du système prétraité en comparaison au système natif ..	42
B) DIAGRAMMES DE PHASES	45
3.4.3 Système IPL-dextran sulfate	45
3.4.5 Système IPL-dextran neutre.....	47
3.5 CONCLUSION	50
3.6 RÉFÉRENCES.....	51
TABLEAUX ET FIGURES.....	55
CONCLUSION GÉNÉRALE	66
BIBLIOGRAPHIE	68
ANNEXE A	74

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau 1.1	Températures et enthalpies de dénaturation d'un concentré de protéines de lactosérum (CPL) en présence de différents sels	22
-------------	---	----

Chapitre 3

Tableau 3.1	Températures de dénaturation d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL), en fonction du pH, de la concentration en protéines, de la concentration en dextran sulfate (DS) et de la présence de 0,5M de NaCl	55
Tableau 3.2	Températures (Td) et enthalpies (ΔH) de dénaturation d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL), à pH 7,0 en présence de dextran sulfate (DS), de κ -Carraghénane (κ -C) ou de xanthane (X).....	56
Tableau 3.3	Enthalpies de dénaturation d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL) en fonction du pH, de la concentration en protéines, de la concentration en dextran sulfate (DS) et de la présence de 0,5M NaCl.	57
Tableau 3.4	Températures (Td) et enthalpies (ΔH) de dénaturation d'un isolat de protéines de lactosérum prétraité (P-IPL) (5%) en présence de 0,5 M de NaCl et de dextran sulfate (DS)	58

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1	Systèmes formés à partir de solutions contenant des protéines et des polysaccharides	9
Figure 1.2	Représentation d'un diagramme de phases	14

Chapitre 3

Figure 3.1	Thermogrammes de solutions (10%) d'isolat de protéines de lactosérum natives (IPL) à pH 7,0 en présence et absence de 0,5M de NaCl	59
Figure 3.2	Thermogrammes de solutions (10%) d'isolat de protéines de lactosérum natives (IPL) à pH 7,0 en présence de 5% dextran sulfate (DS) et de 0,5M de NaCl	60
Figure 3.3	Thermogrammes de solutions (8%) d'isolat de protéines de lactosérum natives (IPL) et prétraitées (P-IPL) à pH 7,0	61
Figure 3.4	Diagramme de phases du système IPL natif-dextran sulfate à pH 7 et en présence de 0,5M de NaCl	62
Figure 3.5	Diagramme de phases du système IPL prétraité-dextran sulfate à pH 7	63
Figure 3.6	Diagramme de phases du système IPL natif-dextran neutre à pH 5,2	64
Figure 3.7	Diagramme de phases du système IPL natif-dextran neutre à pH 7,0	65

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La plupart des aliments que nous consommons sont constitués de protéines et de polysaccharides. Ensemble ces polymères confèrent à nos aliments la majorité de leur structure, texture et stabilité. D'une part, les protéines de lactosérum sont de plus en plus incorporées dans les formulations alimentaires pour leurs bonnes propriétés nutritionnelles et fonctionnelles (Smither *et al.*, 1996). D'autre part, les polysaccharides sont souvent ajoutés aux formulations alimentaires pour les stabiliser, tout au long du procédé de fabrication et jusqu'à l'entreposage d'un produit (Imeson, 1997).

Lors de la fabrication des aliments, les protéines qui les constituent subissent divers traitements qui peuvent modifier leurs caractéristiques physiques et leurs propriétés. Par exemple, le traitement thermique qui survient dans la plupart des procédés de fabrication de nos aliments provoque des changements de structure des protéines. L'altération de leur conformation native permet d'obtenir un état dénaturé ou gélifié recherché, mais peut aussi amener la perte de certaines propriétés comme la solubilité ou l'activité biologique (Smither *et al.*, 1996). Le comportement des protéines est différent lors de la présence de polysaccharides et varie selon le type de polysaccharide (Syrbe *et al.*, 1995). Leur présence peut aussi modifier l'effet qu'ont les différents procédés de transformation sur les propriétés des protéines et possiblement les protéger contre la dénaturation (Gekko et Noguchi 1978; Galazka *et al.*, 1999). L'étude des interactions protéines-polysaccharides est donc indispensable pour la compréhension et la prédiction du comportement des aliments et de l'effet de certaines transformations sur ceux-ci.

Plusieurs techniques d'analyse ont été élaborées afin d'observer le comportement des protéines soumises à des traitements thermiques (Relkin, 1996; Chan, 1983). La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est un outil important en analyse thermique alimentaire qui peut nous permettre d'observer l'influence de la présence de substances en solution comme le sel ou les polysaccharides sur la stabilité thermique des protéines de lactosérum (Ma *et al.*, 1990).

Depuis quelques années, l'effet de polysaccharides sur le comportement de protéines en solution, en gel ou en émulsion fait l'objet d'un nombre croissant de recherches, étant donné le grand nombre d'applications possibles de ces systèmes (Dickinson, 1993). En solution, les mélanges protéines-polysaccharides donnent des systèmes qui sont co-solubles, incompatibles, ou complexés selon les caractéristiques structurales des polymères (i.e. leurs poids moléculaires, la présence de groupements hydrophobes sur les molécules et leur charge). Ces systèmes, qui peuvent généralement être visualisés par diagrammes de phases, sont grandement influencés par le pH, la température, la force ionique de la solution et la concentration des divers polymères (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1986).

Malgré de nombreuses études portant sur les protéines du lactosérum, leur comportement en solution est encore difficile à prédire puisqu'il varie significativement selon les autres substances présentes dans son environnement. Cette étude vise à étudier la stabilité thermique d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL) en présence de polysaccharides anionique ainsi qu'à caractériser le comportement de systèmes IPL-dextrans en solution aqueuse afin de mieux comprendre les interactions qui entrent en jeu dans ces types de systèmes protéines-polysaccharides.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les protéines de lactosérum

1.1.1 Introduction

Le lactosérum est le liquide expulsé d'un caillé acide ou présure lors de la fabrication fromagère. Traditionnellement, le lactosérum était vu comme un sous-produit négligeable de la fabrication fromagère et était jeté dans les cours d'eau avoisinant les industries ou donné en nourriture aux animaux. Toutefois, le lactosérum est reconnu depuis plusieurs années comme un co-produit de la fabrication fromagère ayant une haute valeur commerciale (Smither *et al.*, 1996). Les protéines de lactosérum représentent une source de protéines nutritionnelles, par leur contenu en acides aminés essentiels et d'ingrédients protéiques fonctionnels. La fonctionnalité d'un ingrédient est reliée aux rôles qu'il joue dans les aliments qui, dans le cas des protéines de lactosérum, sont principalement la gélification, l'émulsification et la formation de mousse (Galani et Owusu, 1996).

La production mondiale de lactosérum est évaluée annuellement à environ 118 millions de tonnes (au début des années 1990), dont 62% est réutilisée sous forme d'alimentation animale ou réintégrée dans l'industrie sous forme de divers constituants fonctionnels destinés à l'alimentation humaine (de Wit, 1998; Riedel, 1994). Ces constituants sont principalement des concentrés de protéines de lactosérum (CPL) qui contiennent de 35 à 80% de protéines, des isolats de protéines de lactosérum (IPL) qui contiennent plus de 80% de protéines ou de lactosérum déminéralisé (Cayot et Lorient, 1998; de Wit, 1998).

Les protéines de lactosérum sont de plus en plus utilisées dans les formulations alimentaires afin d'ajouter une plus-value tant nutritionnelle que monétaire à une gamme d'aliments spécialisés. En Amérique du Nord et en Asie, l'industrie des aliments fonctionnels se développe très rapidement et le marché mondial de ce secteur alimentaire atteindra les 50 milliards de dollars d'ici l'an 2000 (Smither *et al.*, 1996). Des études ont démontré que certaines de ces protéines sériques possèdent des propriétés biologiques comme une action anticancéreuse (Smither *et al.*, 1996). L'ingestion d'aliments riches en protéines de lactosérum pourrait donc faire diminuer le développement et les coûts médicaux associés à certaines des maladies les plus répandues dans nos sociétés industrialisées. Toutefois,

l'activité biologique de ces protéines est dépendante de ses conditions de transformation et de sa conformation native (Smither *et al.*, 1996).

1.1.2 La composition du lactosérum

Les protéines de lactosérum représentent environ 20% de la totalité des protéines laitières et sont principalement constituées de β -lactoglobuline (56-60%), d' α -lactalbumine (18-24%), d'immunoglobuline (6-12%) et de sérum-albumine (6-12%). De plus, elles contiennent de la lactoferrine, du lysozyme et des fragments de β -caséine, anciennement connus sous le nom de protéoses peptones (Galani et Owusu, 1996).

1.1.3 La β -lactoglobuline

La β -lactoglobuline dont la masse moléculaire est de 18 400 Da, est formée d'une seule chaîne polypeptidique de 162 acides aminés, de deux liens disulfures et d'un groupement thiol libre. La β -lactoglobuline est une protéine globulaire dont la structure tertiaire est maintenue par 2 ponts disulfures. Sa structure secondaire est formée d'une majorité de feuillets β (40 à 50% des acides aminés seraient situés dans ce type de structure secondaire), d'hélices α (10 à 15%) et de coudes β (10 à 15%) (Fox, 1989; de Wit, 1989).

A température ambiante et à un pH près de son point isoélectrique (pI=5,2), la β -lactoglobuline existe sous forme de dimère stable en raison des interactions électrostatiques entre les acides aminés : Asp¹³⁰ et Glu¹³⁴ d'un monomère et l'acide aminé Lys d'un autre monomère (Kinsella *et al.*, 1989). À partir de pH 6,5 le dimère commence à se dissocier, puis se dénature de façon irréversible. Suivant cette dénaturation, plusieurs groupements deviennent plus réactifs, incluant le groupe thiol et un groupe carboxyle. La réactivité de ces groupements peut avoir pour effet de stabiliser la molécule. En fait, lors de traitements thermiques à pH alcalin, les interactions -SH/-SS- jouent un rôle important dans la formation de polymères de haut poids moléculaire (Watanabe et Klostermeyer, 1976).

À pH inférieur à 3, le dimère se dissocie en monomère de façon réversible. Cette dissociation est due aux forces électrostatiques répulsives élevées existant à ce pH. Il n'y a pas de changement important dans la conformation de la molécule suite à cette dissociation même lorsque la température s'élève à 80°C (de Wit et Klarenbeek, 1981).

À son point isoélectrique (pH 5,2), la β -lactoglobuline possède une charge globale nulle. Lorsque le pH s'éloigne du pI, la charge de la β -lactoglobuline augmente passant de 4 charges par monomère à pH 6,5 à 7 charges à pH 7,5. La réduction du nombre de charges de même signe, à des pH de plus en plus près du pI, peut faciliter le rapprochement des groupements internes de la structure de la protéine. Ceci pourrait aussi avoir pour effet d'augmenter la quantité d'interactions hydrophobes et des forces de van der Waals intramoléculaires et de stabiliser la protéine (Kella et Kinsella, 1988; McKenzie, 1970; Schulz et Schirmer, 1979).

1.1.4 L' α -lactalbumine

L' α -lactalbumine est une petite protéine dont la masse moléculaire est de 14 200 Da. Elle est formée de 123 acides aminés, possède 4 groupements disulfures mais aucun groupement thiol libre. Sa structure secondaire est composée de 26% d'hélices α , de 14% de feuillets β et de 60% de structure non organisée incluant les coudes β . Cette protéine se retrouve habituellement sous forme de monomères de forme très compacte et globulaire (Fox, 1989; Galani et Owusu, 1996).

L' α -lactalbumine est reconnue pour être très stable à la dénaturation thermique mais elle possède en fait, la capacité de retrouver sa structure native lors d'un refroidissement (de 80 à 90% de la dénaturation de cette protéine est réversible). Toutefois, elle peut aussi subir de la dénaturation irréversible en raison de la formation de liens disulfures intermoléculaires (Fox, 1989).

1.1.5 La sérum-albumine

La sérum-albumine bovine (BSA) est formée d'une chaîne de 582 acides aminés et possède un poids moléculaire de 66 267 Da. Elle contient 17 liens disulfures intramoléculaires et un groupement thiol libre. Il est estimé qu'environ 55% des résidus de la BSA se retrouvent dans des structures formant des hélices α et 16% dans des feuillets β . Puisque la BSA représente moins de 10% des protéines de lactosérum, il est généralement considéré qu'elle a peu d'effet sur les propriétés fonctionnelles des préparations de protéines de lactosérum (Fox, 1989).

1.1.6 Les immunoglobulines

Les immunoglobulines forment un mélange complexe de glycoprotéines qui possèdent une activité immunologique. Le rôle primaire de ces protéines est d'apporter une forme d'immunité au nouveau-né. La contribution des immunoglobulines aux propriétés fonctionnelles du lait ou du lactosérum a été généralement ignorée. De l'intérêt commence toutefois à se manifester au niveau de l'alimentation animale où elles pourraient servir à l'enrichissement du lait des veaux afin d'améliorer leur santé (Fox, 1989; Galani et Owusu, 1996).

1.1.7 Les isolats de protéines de lactosérum

Les protéines du lactosérum transformées sont principalement retrouvées sous la forme de concentrés protéiques de lactosérum (CPL) et d'isolat de protéines de lactosérum (IPL). Les CPL sont obtenus par ultrafiltration et diafiltration, et contiennent généralement de 35 à 80% de protéines. Par contre, les IPL sont obtenus par chromatographie d'échanges d'ions ou microfiltration ce qui permet d'obtenir des concentrés contenant plus de 80% de protéines (Cayot et Lorient, 1998; de Witt, 1996; Walstra *et al.*, 1999). Les IPL sont reconnus pour leur bonne solubilité et contiennent en moyenne 68% de β -lactoglobuline, 7% d' α -lactalbumine, 17% de sérum-albumine bovine et 7% d'immunoglobuline (Morr et Foegeding, 1990).

1.2 Systèmes protéines-polysaccharides

1.2.1 Introduction

Les interactions protéines-polysaccharides sont utilisées depuis le début du siècle pour réaliser la séparation des protéines, augmenter la stabilisation de systèmes protéiques et diminuer leur précipitation dans plusieurs produits alimentaires (Ledward, 1994). Au cours des vingt dernières années, il y a eu un intérêt grandissant pour ce sujet, qui s'explique par le grand nombre d'applications possibles de ces systèmes.

Les protéines-polysaccharides en mélange donnent des systèmes qui peuvent être co-solubles, incompatibles, ou complexés en solution. La Figure 1.1 résume les différents systèmes que forment en solution les protéines et les polysaccharides (Tolstoguzov, 1991).

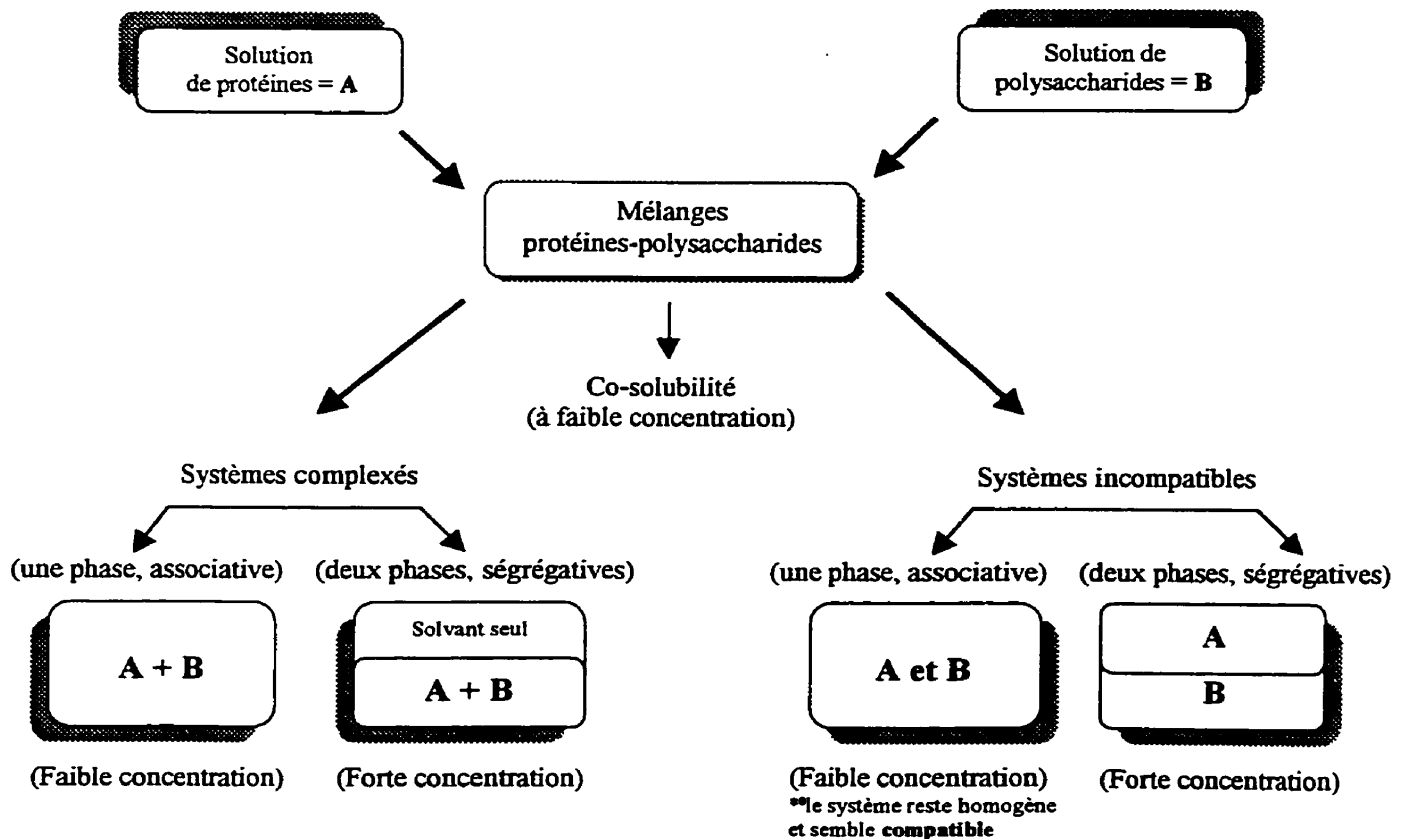


Figure 1.1 : Systèmes formés à partir de solutions contenant des protéines et des polysaccharides.

Sauf à très faibles concentrations, la co-solubilité est très rare, étant donné la nature des polymères. La formation de différents systèmes est due aux caractéristiques structurales des polymères c'est-à-dire leur poids moléculaire, la présence de groupements hydrophobes sur les molécules et la charge des polymères. De plus, le pH, la température, la force ionique de la solution de même que la concentration des divers polymères influencent le type de système formé (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1986).

1.2.2 Systèmes complexés

Lorsque les interactions sont attractives, les deux polymères sont complexés résultant en une ou deux phases associatives (Ledward, 1994). Lorsque les complexes protéines-polysaccharides sont solubles en solution, il n'y a qu'une seule phase (Figure 1.1). Mais lorsqu'ils sont insolubles, on retrouve deux phases, l'une contenant les complexes insolubles et l'autre composée principalement de solvant (Tolstoguzov, 1991).

1.2.2.1 Effet du pH et des charges des polysaccharides

En général, les interactions moléculaires attractives entre protéines et polysaccharides sont faibles lorsque des protéines portant une charge neutre ou négative (le pH est supérieur à leur pI) sont en présence de polysaccharides en solution. Par contre, les interactions macromoléculaires attractives sont fortes lorsque des protéines portant une charge nette positive ($\text{pH} < \text{pI}$) se retrouvent en présence de polysaccharides anioniques (Dickinson, 1993). Ce genre de complexe a déjà été étudié à l'aide de diverses protéines et de polysaccharides anioniques comme l'alginate ou la carboxyméthylcellulose ou des polysaccharides sulfatés comme la carraghénane (Ledward, 1994).

En général, une solution de protéines globulaires et de polysaccharides anioniques forme des complexes insolubles lorsqu'elle est formée à un pH où les deux polymères portent des charges opposées. Cependant, il est possible de favoriser la formation de complexes solubles en acidifiant lentement une solution contenant des polysaccharides anioniques et des protéines chargées positivement. Ces complexes resteront solubles même dans des conditions où habituellement la protéine seule est insoluble (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1986).

Les polysaccharides portant des groupements carboxyles ont tendance à ne pas former de complexes avec les protéines globulaires lorsque le pH est supérieur au pI. Toutefois, des polysaccharides sulfatés très chargés peuvent former des complexes solubles même lorsque le pH est supérieur au pI de la protéine. La formation de tels complexes a été rapportée pour les dextrans sulfatés et la sérum-albumine bovine jusqu'à des pH atteignant 8,5 (Tolstoguzov, 1986). En fait, même si la charge totale des protéines est négative, à des pH supérieurs au pI, une formation de complexes serait possible s'il existait des zones chargées positivement sur la structure des protéines (provenant des nombreux groupements cationiques situés sur leur structure extérieure). Des interactions attractives se produiraient entre ces régions positivement chargées et les polysaccharides anioniques (Noguchi, 1956). Ce phénomène a aussi été observé entre le κ -carraghénane et la caséine kappa du lait (Snoeren *et al.*, 1975).

1.2.2.2. Interactions fortes et lien covalent

En général, la formation de complexes solubles ou insolubles est réalisée à l'aide d'interactions moléculaires de forces faibles (interactions électrostatiques, liaisons hydrophobes et hydrogène). Toutefois, lorsqu'il y a présence d'interactions fortes, c'est-à-dire lorsqu'une protéine chargée positivement ($\text{pH} < \text{pI}$) se retrouve en présence d'un polysaccharide anionique, la formation de liens covalents entre les polysaccharides et les protéines est possible. La liaison peut se produire lorsque les deux polymères sont soumis à un léger traitement de chaleur de 60°C (lorsque l'activité de l'eau est faible) ou bien lorsque les deux polymères sont mélangés ensemble en condition alcaline (pH 9 à 11) pendant quelques minutes et que le pH est ensuite diminué à une valeur neutre ou acide. (Dickinson, 1993; 1995). Il en résulte un « conjugat » dont la particularité est d'être beaucoup plus stable que les complexes protéines-polysaccharides. Plusieurs études sur les « conjugats » ont été réalisées à l'aide de divers complexes (BSA-dextran, β -lactoglobuline-dextran et β -lactoglobuline-dextran sulfate) et ont permis de comparer la stabilité des émulsions produites par ceux-ci (Dickinson et Galazka, 1991; Dickinson, 1993). Toutefois, les conditions expérimentales utilisées dans cette étude ne favorisent pas la formation de conjugats mais favoriseront plutôt les interactions de forces faibles puisque les solutions étudiées auront un pH égale ou supérieur au pI.

1.2.3 Systèmes incompatibles

Les systèmes incompatibles peuvent être composés d'une phase contenant simultanément les deux polymères (phase associative) ou bien de deux phases distinctes qui ne contiennent principalement qu'un seul des deux polymères (phase ségrégative) (Figure 1.1). Les protéines et les polysaccharides se retrouvent en solution dans la même phase lorsque leurs concentrations sont sous le seuil de la séparation de phases puisqu'il se produit peu d'interactions répulsives entre eux (Albertsson, 1995; Tolstoguzov, 1991).

Lorsque deux polymères se retrouvent dans une même solution, ils peuvent agir comme si leurs concentrations étaient supérieures à ce qu'elles sont vraiment, puisqu'il y a moins de solvant disponible pour chacun d'eux. Cette compétition pour le solvant et les forces répulsives qui sont présentes en solution peuvent amener un des polymères à repousser l'autre polymère de son milieu et à la séparation de phases (phases ségrégatives). De tels systèmes incompatibles, formés par des réactions endothermiques et caractérisés par des forces répulsives entre les polymères sont souvent désignés par le terme : incompatibilité thermodynamique (Tolstoguzov, 1991).

Lorsque les protéines et les polysaccharides d'un système portent des charges semblables, les interactions présentes sont répulsives plutôt qu'attractives. Elles ne favorisent pas l'association entre les deux polymères mais plutôt entre les polymères de même nature (protéines-protéines et polysaccharides-polysaccharides). Les polysaccharides, en se regroupant entre eux, ont tendance à repousser les autres polymères présents en solution. L'efficacité que possède certains polysaccharides à exclure de leur milieu des protéines dépend de plusieurs facteurs, principalement du pH du système et des charges que porte le polysaccharide. Une bonne flexibilité de la chaîne moléculaire, un poids moléculaire élevé et une forte concentration en sel sont aussi des facteurs qui augmentent la capacité d'un polysaccharide à repousser une autre macromolécule de son milieu et à provoquer une séparation de phases (Albertsson, 1995; Ledward, 1994). En général, l'association entre les protéines est due aux interactions hydrophobes, aux liaisons hydrogène et aux interactions électrostatiques. Ainsi l'incompatibilité thermodynamique est généralement favorisée par une

augmentation de la température, un ajustement du pH vers le pI des protéines et par la protonation des groupements carboxyl des protéines (Tolstoguzov, 1986).

Les conditions pour obtenir une séparation de phases sont donc différentes selon que le polysaccharide du système est carboxylé, neutre ou sulfaté. Par exemple, l'incompatibilité thermodynamique d'un système contenant des protéines et des polysaccharides neutres augmente lorsque le pH s'approche du pI, et lorsque le poids moléculaire du polysaccharide ou la concentration en sel augmente. Cependant, l'incompatibilité thermodynamique d'un système contenant des protéines et des polysaccharides sulfatés est augmentée lorsque le pH de la solution s'éloigne du pI. Autour du pI, il existerait une région correspondant à une compatibilité complète de ce système. Par contre, ce système présentera une séparation de phases seulement à une force ionique supérieure à 0,5 peu importe le pH. Dans le cas d'une solution contenant des protéines et des polysaccharides carboxylés, celle-ci possède une compatibilité limitée lorsque la formation de complexes est inhibée, c'est-à-dire lorsque le pH excède le pI de la protéine (peu importe la force ionique) ou lorsque le pH est égal ou inférieur au pI en présence d'une force ionique de 0,25 (Tolstoguzov, 1986).

1.2.4 Les diagrammes de phases

L'incompatibilité d'un système protéines-polysaccharides peut être représentée à l'aide d'un diagramme de phases (Figure 1.2).

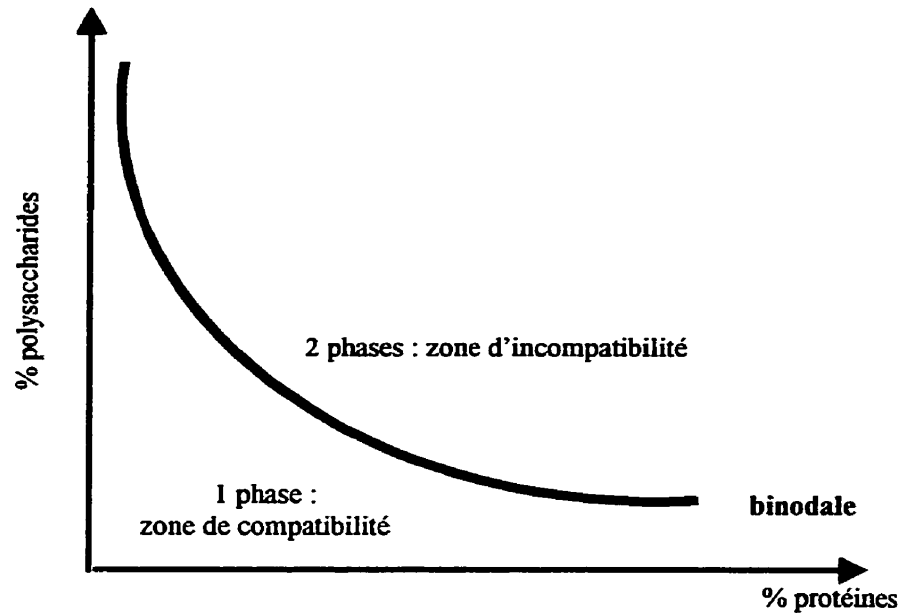


Figure 1.2 : Représentation d'un diagramme de phases (adaptée de Tolstoguzov, 1995).

La courbe séparant la zone de compatibilité et d'incompatibilité se nomme la binodale. La co-solubilité des deux polymères se situe sous la binodale et l'incompatibilité des deux polymères est représentée par la région au-dessus de la binodale. Dans cette dernière région, les systèmes protéine-polysaccharide-eau se sépareront généralement en deux phases puisque les forces répulsives sont fortes entre les deux polymères. Sous la binodale, les polymères co-solubles formeront toutefois des solutions à une seule phase puisque les concentrations de chaque constituant ou d'au moins un des deux constituants est sous le seuil critique de séparation. Les forces de répulsion entre les polymères ne sont pas assez élevées pour entraîner une incompatibilité visible soit par turbidité ou séparation de phases (Tolstoguzov, 1995).

Plusieurs facteurs influencent le seuil de séparation de phases et par le même fait, l'allure d'un diagramme de phases comme par exemple le type et la structure des protéines. En général, pour des systèmes contenant des protéines globulaires (comme les protéines de lactosérum) et des polysaccharides, la séparation de phases se produit quand la concentration totale en macromolécules du système excède les 4%, et varie selon le pH et la force ionique. Par contre, pour des systèmes protéines-protéines, la concentration est généralement de 15% et pour des systèmes caséines-polysaccharides ou gélatine-polysaccharides, elle est généralement sous 3% (Tolstoguzov, 1986; 1997).

Pour ce qui est des polysaccharides, plus celui-ci est hydrophile, linéaire et de poids moléculaire élevé, plus la séparation de phases est marquée (Grinberg et Tolstoguzov, 1997). En général, les diagrammes de phases contenant des polysaccharides neutres ou sulfatés démontrent une séparation de phases à faible concentration en polymères et à faibles forces ioniques. De plus, la binodale du diagramme de phases d'un certain système peut être déplacée facilement par de légers changements de température ou du pH.

1.3 Effet de la chaleur sur les protéines de lactosérum

1.3.1 Effet de la chaleur sur la conformation des protéines

Les traitements thermiques sont d'une grande importance pour la production, la concentration et la transformation des protéines alimentaires (Relkin, 1994). À l'état natif, les protéines globulaires possèdent une structure compacte afin de diminuer le plus possible la surface de contact de leurs chaînes latérales non polaires avec le solvant. Cette structure compacte est adoptée afin de réduire l'entropie du système qui serait trop élevée pour solubiliser les nombreux groupements de liaisons non hydrogène intramoléculaires dans un état déployé (Brady, 1989). Il en résulte ainsi un grand nombre de liaisons non covalentes à l'intérieur de la molécule, entre les molécules ou entre la molécule et le solvant (Relkin, 1996).

Un chauffage modéré (en dessous de 60°C) entraîne le déploiement des protéines de lactosérum. Un chauffage à une température supérieure à 65°C entraîne la dénaturation de la protéine ce qui implique un changement important au niveau de la conformation native de celle-ci (Galani et Owusu, 1996). En général, le chauffage de protéines globulaires entraîne la destruction de certaines forces qui stabilisent leur structure tertiaire et /ou secondaire, par exemple les interactions hydrogène entre les groupements polaires et les interactions de groupements non polaires (interactions hydrophobes), à l'aide des molécules d'eau avoisinantes qui enveloppaient jusque là, la structure des protéines (Relkin, 1994).

La dénaturation réversible se produit lorsque les liens intramoléculaires de l'état natif sont premièrement brisés et que la protéine est déployée dans son état dénaturé. Toutefois, la dénaturation deviendra irréversible, même à chauffage modéré (moins de 100°C), s'il se produit de l'agrégation, de l'hydrolyse de liens peptidiques ou de la désamination protéique (Galani et Owusu, 1996). Le traitement thermique de protéines de lactosérum, à des pH près de la neutralité, peut entraîner une perte considérable de la solubilité de celles-ci. À ce pH, les protéines dénaturées thermiquement interagissent par des réactions irréversibles thiol-disulfures pour former des agrégats qui se regroupent ensemble et forment de plus grosses particules, entraînant la précipitation (Morr et Josephson, 1968; Galani et Owusu, 1996).

Cette coagulation protéique induite thermiquement représente un problème sérieux pour la fabrication de produits contenant des protéines de lactosérum lorsque le procédé thermique est réalisé dans des conditions favorisant l'agrégation protéique (Barlow *et al.*, 1984).

Le contrôle de la dénaturation des protéines de lactosérum est important car, d'une part elle peut causer de nombreux défauts, tels la formation de dépôts durant le traitement thermique du lait, une faible stabilité du lait à la chaleur, le développement d'une saveur de cuit (due à l'augmentation de l'activité des groupements SH- le long des chaînes latérales) et la réduction de la solubilité des protéines et de leur fonctionnalité. D'autre part, la dénaturation des protéines de lactosérum contrôlée permettra d'obtenir des modifications ou améliorations de produits désirées et des textures particulières comme des gels. La dénaturation des protéines de lactosérum est utilisée par exemple, pour l'amélioration de la texture du yogourt et l'augmentation du rendement fromager (Galani et Owusu, 1996; Molder et Jones, 1987).

1.3.2 Prédominance de la β -lactoglobuline

Plusieurs auteurs considèrent que le comportement des protéines de lactosérum est principalement influencé par son contenu en β -lactoglobuline. En fait, l'étude de lait ou de lactosérum reconstitués à partir de leurs fractions protéiques, dans leurs proportions respectives, a démontré que la β -lactoglobuline détermine les propriétés rhéologiques et fonctionnelles des solutions reconstituées et ainsi celles des protéines de lactosérum (de Wit et Klarenbeek, 1981; Kinsella, 1984). De plus, selon Bernal et Jelen (1985) le comportement thermique (agrégation et précipitation) d'un concentré de protéines de lactosérum (CPL) obtenu par ultrafiltration semble être contrôlé par la fraction dominante de protéines constituée de β -lactoglobuline. Dans la littérature, les résultats obtenus avec des solutions d'IPL ou de CPL sont souvent comparés aux résultats obtenus dans des études portant seulement sur la β -lactoglobuline.

1.3.3 Effet de la conformation des protéines sur l'incompatibilité des systèmes

La conformation des protéines d'un système peut grandement influencer leur compatibilité avec les autres polymères en solution. Les protéines de lactosérum à l'état natif démontrent un comportement très différent en présence de polysaccharides qu'à l'état dénaturé (Syrbe *et al.*, 1995). Les protéines de lactosérum à leur état natif forment généralement des systèmes incompatibles avec des polysaccharides tel l'arabinogalactan, le dextran et la méthylcellulose, à des pH supérieurs à leur pI. Cependant, des systèmes homogènes sont formés avec de la gomme de guar, de la pectine, de la k-carraghénane, du xanthane et de la carboxyméthylcellulose, encore une fois à des pH supérieurs au pI. En présence de protéines dénaturées, ces systèmes contenant des polysaccharides comme la méthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, la gomme de guar et la k-carraghénane forment des systèmes incompatibles présentant une séparation de phases. Cependant, les systèmes qui contiennent des maltodextrines, de l'arabinogalactan ou du dextran neutre forment des systèmes homogènes (co-soluble) à pH 7. Il faut néanmoins considérer que les concentrations en protéines dans des systèmes dénaturés ne peuvent être aussi élevées que dans des systèmes natifs sans provoquer la gélification de la solution de protéines dénaturées (Syrbe *et al.*, 1995).

1.3.4 Mesure de la dénaturation des protéines

La dénaturation des protéines de lactosérum a été étudiée à l'aide de différentes méthodes comme par exemple, la spectroscopie infrarouge, la résonance magnétique nucléaire (RMN), l'électrophorèse, la chromatographie, la turbidimétrie et la calorimétrie. Ces méthodes ont démontré que la dénaturation thermique des protéines globulaires était influencée par le pH, la concentration en protéines et la présence de divers sels en solutions (NaCl, CaCl₂, etc.) (Relkin, 1996; Chan, 1983; Xiong *et al.*, 1993).

1.3.4.1 Effet protecteur de polysaccharides en présence de protéines

L'effet de la présence de sucres comme le glucose, le sucrose, le lactose, ainsi que de polysaccharides comme les carraghénanes sur la dénaturation thermique de diverses protéines a été étudié (Galazka *et al.*, 1996; Boye *et al.*, 1996). Il a été démontré que ces

substances pouvaient avoir un effet protecteur sur la structure des protéines. Par exemple, Gekko et Noguchi (1978) ont étudié l'effet du dextran sulfate et carboxyméthyl-dextran sur la précipitation thermique de protéines BPA (bovine plasma albumine) à l'aide de mesures de turbidimétrie. Ils ont conclu que l'ajout de ces polysaccharides peut avoir un effet protecteur sur la protéine lorsqu'elle subit un traitement thermique portant à la précipitation. La concentration maximale de polysaccharides qui correspondait à un maximum de turbidité dépendait de la température du traitement thermique et du type de groupements ionisables des polysaccharides ajoutés. De plus, ils ont démontré que le changement de turbidité, lors de l'ajout de polysaccharides, n'était pas seulement dû à l'effet de salting-in ou salting-out que peut apporter l'ajout de polyions dans une solution. En effet, l'ajout de NaCl et d'ions phosphate n'amenait pas de changements de turbidimétrie à une solution semblable de protéines. D'autre part, l'ajout de dextran neutre n'a pas apporté de changement de turbidité et n'a pas protégé la BPA contre la précipitation thermique. Ceci suppose que les interactions dipôle-dipôle entre les groupements OH du dextran et de la protéine sont négligeables pour la précipitation thermique. Ainsi, les changements de turbidité peuvent être attribués principalement aux interactions électrostatiques entre la BPA et les polyions.

1.4 La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

1.4.1 Introduction

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est l'une des techniques d'analyses thermiques les plus utilisées. Elle est basée sur le principe que lorsqu'un matériel subit un changement physique ou chimique de la chaleur est, soit absorbée (endothermique) soit dégagée (exothermique). Le calorimètre mesure la différence d'énergie qu'il faut fournir entre un échantillon et une référence, en fonction de la température pendant que ceux-ci sont soumis à un programme contrôlé de température (Ma *et al.*, 1990).

La DSC peut être utilisée pour détecter les changements de conformation de la structure des protéines globulaires qui surviennent lors de leur dénaturation. En fait, lors de traitements thermiques, des changements intramoléculaires surviennent au niveau des liens hydrogène et provoquent le déploiement initial des protéines. Ces changements résultent d'un processus endothermique, contrairement à l'agrégation et au bris d'interactions hydrophobes qui sont des processus exothermiques (Privalov, 1982). L'enthalpie donnée par une mesure de DSC est en fait la somme des transitions endothermiques et exothermiques qui se produisent durant un traitement thermique. La température de dénaturation (T_d en °C) est observée au sommet du pic du thermogramme et l'enthalpie (ΔH en J/g) est estimée par l'air sous la courbe de celui-ci par rapport au poids de l'échantillon analysé (Ma *et al.*, 1990).

1.4.2 La température de dénaturation

La calorimétrie différentielle à balayage a déjà été utilisée pour l'étude de la dénaturation thermique de diverses protéines globulaires dont les protéines de lactosérum, à divers pH et en présence d'ions (Bernal et Jelen, 1985; Relkin, 1994, 1996).

Lui *et al.* (1994) ont étudié la dénaturation de la β -lactoglobuline à l'aide de la DSC et ont conclu que la dénaturation thermique était dépendante du pH. La faible réactivité des groupements SH et la réversibilité partielle de la dénaturation thermique à des pH acides démontrent que la β -lactoglobuline y est plus résistante thermiquement qu'à pH alcalin.

Kella et Kinsella (1988) ont suggéré que l'augmentation de la stabilité de la β -lactoglobuline est causée par la présence d'un plus grand nombre de liens hydrogène lors d'une baisse de pH.

La température de dénaturation de la β -lactoglobuline à différents pH a aussi été étudiée par Boye *et al.*, (1996) pour des échantillons solubilisés dans des tampons de phosphate de deutérium à une concentration de 20% de protéines. Ils ont observé, par DSC, qu'avec l'abaissement du pH, la température de dénaturation augmentait et que la plus grande variation se situait entre les pH 7 et 5 (soit 73°C à pH 7 et 82°C à pH 5). De plus, Park et Lund (1984) ont observé que la β -lactoglobuline était plus stable, c'est-à-dire plus résistante à la dénaturation à pH 5 et 7.

Toujours à l'aide de la calorimétrie, des études portant sur l'effet de différents sels et sucres ont été réalisées. Celles-ci ont démontré que, selon les charges et les concentrations de ces substances, un effet protecteur sur la protéine pouvait être observé et mesuré par l'augmentation de la température de dénaturation et s'expliquer par une augmentation de la stabilité de la structure de la protéine (Boye *et al.*, 1997, Bull et Breese, 1978; Varunsatian *et al.*, 1983).

1.4.3 L'enthalpie de dénaturation

Les calorimètres différentiels à balayage sont conçus pour déterminer les enthalpies des changements d'état physique tel que la fusion ou la dénaturation, en mesurant le flux de chaleur différentiel nécessaire pour maintenir l'échantillon de matériau et une référence inerte à la même température (Ma *et al.*, 1990). L'enthalpie représente donc une mesure de la quantité d'énergie calorifique nécessaire pour faire passer une certaine quantité de protéines de l'état natif à dénaturé (Barbeau *et al.*, 1996).

Lors d'un traitement thermique (dans l'intervalle de température allant de 60 à 80°C), les interactions hydrophiles (les liaisons hydrogène, les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques entre les groupements chargés, et les liens spécifiques) sont

affaiblies, tandis que les interactions hydrophobes sont renforcées. Les interactions hydrophobes sont exothermiques contrairement à la rupture des autres liens et interactions qui sont endothermiques (Privalov, 1982; Relkin, 1996). L'enthalpie donnée par une mesure de DSC est en fait la somme des transitions endothermiques et exothermiques qui se produisent durant un traitement thermique. La dénaturation de protéines globulaires est observable sur un thermogramme de DSC par un pic endothermique (Ma *et al.*, 1990) étant donné le grand nombre de changements qui surviennent au niveau des liaisons hydrogène intramoléculaires.

Varunsatian *et al.*, (1983) ont étudié à l'aide de DSC, la température et l'enthalpie de dénaturation d'un concentré de protéines de lactosérum (CPL) en présence de différents sels (Tableau 1).

Tableau 1 : Températures et enthalpies de dénaturation d'un concentré de protéines de lactosérum (CPL) en présence de différents sels.

Additions de sels	Température de dénaturation (°C)	Enthalpie de dénaturation (J/g)
Aucun	75,2	9,37
NaCl	76,5	11,88
MgCl ₂	73,5	10,58
CaCl ₂	71,5	6,52

- La concentration des solutions de CPL était de 12% de protéines, à pH 6,5 et la force ionique des sels était de 0,1M (Varunsatian *et al.*, 1983).

Plusieurs auteurs ont observé une baisse de la variation de l'enthalpie totale de dénaturation de protéines globulaires lors de l'augmentation de la concentration en protéines et en sel. Cette baisse est généralement attribuée à l'augmentation des interactions hydrophobes intramoléculaires qui sont de nature exothermique (Relkin, 1996; Kristensen *et al.*, 1997; Relkin et Launay, 1990).

De plus, Relkin (1996) a observé que pour la β -lactoglobuline, l'ajout de cations divalents amène une plus forte diminution de l'enthalpie que l'ajout de cations monovalents, à pH 7.

Dans ces cas, la diminution de l'enthalpie lors de l'ajout de Ca^{++} ou de Mg^{++} a aussi été associée aux interactions hydrophobes intramoléculaires. En fait, à pH 7, ces protéines ont une charge totale négative et les cations peuvent s'y lier. Il semblerait que les ions Ca^{++} déstabilisent plus les interactions hydrophobes que les ions Na^+ , K^+ et Mg^{++} . De plus, l'addition de cations monovalents a un effet moins marqué à des pH acides contrairement à un pH alcalin (Relkin, 1994).

À ce jour, peu d'études ont été réalisées sur l'effet de la présence de polysaccharides sur la température ou l'enthalpie de dénaturation des protéines du lactosérum. La plupart des études antérieures sont axées sur l'effet de la présence de petits saccharides et de sels (retrouvés habituellement dans le lait) sur la température de dénaturation de ces protéines.

1.5 Le dextran

1.5.1 Introduction et historique

Pendant de nombreuses années, le dextran était reconnu comme étant un fléau industriel. Il se développait lorsque les aliments ou breuvages contenant du sucrose étaient contaminés par des micro-organismes producteurs de ce polysaccharide. La production de dextran représentait donc un défaut majeur lors de la transformation et de l'entreposage d'aliments comme le sucre, puisque le jus de la betterave et de la canne à sucre étaient particulièrement susceptibles à cette dégradation microbiologique (Glicksman, 1982).

Au début des années quarante, de nombreuses recherches ont permis de développer un agent extenseur de plasma à base de dextran qui permettait de rétablir le volume et la pression sanguine d'un patient en état de choc. Cet agent a été grandement produit dans les années 50 et 60 et utilisé sur les champs de batailles de Corée et du Viêt-nam pour soigner les blessés qui avaient besoin de grandes quantités de sang souvent non disponibles. Il a aussi été fortement commercialisé et stocké dans les abris antiatomiques ou nucléaires construits aux États-Unis au début de la guerre froide (Glicksman, 1982).

Encore aujourd'hui, l'usage du dextran est donc principalement pharmacologique. Il est utilisé dans l'enrobage de comprimés avec de la méthylcellulose afin de masquer le goût et de diminuer l'irritation de l'estomac (Benger Labs., 1966; Bakan, 1971). Il est peu utilisé en industrie alimentaire puisqu'il n'a pas la propriété d'augmenter la viscosité d'une solution ou de former un gel ayant les mêmes propriétés que la plupart des polysaccharides fréquemment utilisés. Malgré cela, de nombreux brevets ont été émis dans les années 50 et 60 pour une panoplie d'aliments contenant du dextran ou ses dérivés, mais ils ont été très peu commercialisés puisqu'ils n'ont pas subi la batterie de tests toxicologiques déterminant leur innocuité. En fait, le dextran (100 000 Da) était approuvé GRAS (Generally Recognized As Safe) par le gouvernement américain jusqu'en 1977 mais après cette date il fut omis de la liste de polysaccharides approuvés car trop peu utilisé. De nos jours, le dextran n'est toujours pas approuvé comme additif alimentaire au Royaume-Uni et en Europe, mais est cependant approuvé dans divers matériaux d'emballage (McCurdy *et al.*, 1994; Whistler, 1973; de Belder, 1993).

1.5.2 La structure du dextran et de ses dérivés

Le dextran fut le premier polysaccharide d'origine microbienne à être commercialisé. Il est catabolisé par la dextransucrase, un enzyme extracellulaire des *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL-512) qui transfère des groupements glucosyles provenant du sucrose, à la chaîne de dextran en développement par les bactéries (McCurdy *et al.*, 1994).

Il est composé d'une seule sous unité de glucose (sous forme d' α -D-glucopyranosyle) et est principalement lié par des liens 1-6 (95%) et 1-3 (5%). Les liens 1-6 confèrent à sa chaîne moléculaire une très grande flexibilité et par conséquent, une très grande solubilité en solution aqueuse. La présence de liens 1-3 le rend ramifié, mais 80% de ces ramifications sont des chaînes très courtes, généralement formées d'une ou deux unités D-glucose (van Cleve *et al.*, 1956; Whistler, 1973). En solution, le dextran semble opter pour une formation en hélice formée de deux chaînes antiparallèles (de Belder, 1993).

Le groupement hydroxyle secondaire de la molécule de dextran est réactif, ce qui rend possible la production d'une variété de dérivés. Les dérivés les plus connus sont le dextran de sulfate de sodium et le dextran diethylaminoethyl (DEAE). De plus, lorsqu'une chaîne de dextran est croisée avec de l'épichlorohydrine sous forme de billes, un polymère bien connu dans le monde de la filtration sur gel, le Sephadex, est formé. Ce produit est grandement utilisé comme outil lors de la séparation de diverses protéines (de Belder, 1993).

Le dextran sulfate est un dérivé polyanionique du dextran produit par l'estérification de celui-ci. Il est retrouvé sous une gamme de poids moléculaire variant de 6000 à 1 000 000 Da. Comme le dextran neutre, il est commercialisé sous la forme d'une poudre blanche et hygroscopique qui peut former des solutions aqueuses plus ou moins visqueuses selon leur poids moléculaire. Le dextran sulfate est facilement solubilisé dans des solutions aqueuses, mais difficilement dans des solutions organiques comme des solutions d'éther, de polyélectrolytes, d'alcool ou de chloroforme. Le dextran neutre en solution est peu affecté par la présence d'ions, mais le dextran sulfate interagit avec les cations et les anions. En fait, une molécule de dextran sulfate peut être décrite comme un infime échangeur de particules (Dextran Products Limited, Spécifications tech.).

Les dextrans ont la particularité d'être inodore, incolore, sans goût, et chimiquement inerte (ils possèdent habituellement une charge neutre à moins d'être dérivés). Ces caractéristiques les rendent très attrayants pour l'usage alimentaire puisque leur addition à une formulation n'entraînera pas de goût, couleur, ou odeur indésirés. De plus, il semble que les variations de pH (allant de pH 4 à 9) aient peu d'effet sur son comportement (McCurdy *et al.*, 1994). Selon leurs charges, les dextrans sont des polysaccharides qui ont une bonne capacité de répulsion, c'est-à-dire qu'ils ont tendance à exclure de leur milieu les autres polymères en solution. C'est pourquoi, ils sont souvent utilisés pour réaliser le fractionnement ou l'exclusion de protéines (Ledward, 1994).

Étant donné la simplicité de leur structure et la possibilité de substituer différemment des groupements ayant différentes charges, les dextrans sont souvent utilisés comme polysaccharides de référence dans des études portant sur les interactions protéines-polysaccharides.

CHAPITRE 2

BUT, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

2.1 But

Le but de ce projet de recherche est d'abord d'étudier l'effet de la présence du dextran sulfate sur la stabilité thermique de protéines de lactosérum natives et prétraitées, en présence et absence de sel, puis de caractériser le comportement en solution de ces protéines en présence de divers dextrans.

2.2 Hypothèse

Le comportement en solution de systèmes IPL-dextrans est différent selon la charge que portent chacun des polymères et la conformation des protéines. La présence de divers polysaccharides et le type de système formé en solution (compatible ou incompatible) peut modifier le comportement des protéines de lactosérum à la dénaturation.

2.3 Objectifs

- 1- Vérifier, par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), l'effet de la présence de diverses concentrations de dextran sulfate sur la température et l'enthalpie de dénaturation d'un IPL natif et prétraité, à pH 5,2 et 7,0 ainsi qu'en présence de NaCl.
- 2- Élaborer les diagrammes de phases des systèmes IPL-dextran neutre et IPL-dextran sulfate à pH 5,2 et 7,0 afin de déterminer quels types de système ils forment (compatibles, incompatibles) en solution.
- 3- Vérifier la relation entre le type de système IPL/dextrans obtenu (compatible ou incompatible) et la stabilité thermique des protéines.

CHAPITRE 3

ÉTUDE DE LA STABILITÉ THERMIQUE DES PROTÉINES DE LACTOSÉRUM ET DE LEUR COMPORTEMENT EN SOLUTION, EN PRÉSENCE DE DIVERS DEXTRANS

3.1 Résumé

La stabilité thermique d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL) a été étudiée par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) en fonction de divers ratios protéines-polysaccharides, du pH et de la présence de NaCl. L'ajout de dextran sulfate semble avoir un effet protecteur sur l'IPL en élevant sa température de dénaturation de plusieurs degrés Celsius. L'ajout de NaCl a un effet similaire, mais l'ajout simultané de NaCl et de dextran sulfate n'apporte pas d'effet protecteur additionnel. L'élaboration des diagrammes de phases des systèmes IPL-dextran sulfaté et neutre, a permis de démontrer que les zones d'incompatibilité des diagrammes correspondent généralement à des températures de dénaturation moins élevées en calorimétrie. Lors d'incompatibilité, les interactions entre polymères de même nature sont favorisées, réduisant l'effet protecteur du polysaccharide sur l'IPL. La compréhension du comportement des systèmes protéines-polysaccharides pourrait donc permettre de prédire la stabilité thermique de protéines en solution.

3.2 Introduction

Les protéines et les polysaccharides sont les principaux constituants de la plupart des aliments que nous consommons. Ensemble, ils confèrent aux aliments la majorité de leur structure, texture et stabilité. D'une part, les protéines de lactosérum sont ajoutées à des formulations alimentaires afin d'obtenir des produits à valeur nutritionnelle enrichie (Smither *et al.*, 1996). D'autre part, les polysaccharides sont souvent ajoutés aux formulations alimentaires pour les stabiliser tout au long du procédé de fabrication et jusqu'à l'entreposage du produit fini (Imeson, 1997).

Lors de la fabrication des aliments, les protéines qui les constituent subissent divers traitements qui peuvent modifier leurs caractéristiques physiques et leurs propriétés. Par exemple, le traitement thermique qui survient dans la plupart des procédés de fabrication de nos aliments (cuisson, pasteurisation, etc.) provoque des changements de structure des protéines. L'altération de leur conformation native permet la formation de gels, mais peut aussi provoquer la perte de certaines de leurs propriétés comme la solubilité ou l'activité biologique (Smither *et al.*, 1996). Lors de la présence de polysaccharides, le comportement des protéines est différent et varie selon le type de polysaccharides. Leur présence peut aussi modifier l'effet des différents procédés de transformation sur les propriétés des protéines et possiblement, les protéger contre la dénaturation (Gekko et Noguchi 1978; Galazka *et al.*, 1999). L'étude des interactions protéines-polysaccharides est donc indispensable pour la compréhension et la prédiction du comportement des aliments et de l'effet de certaines transformations sur ceux-ci.

Plusieurs techniques d'analyse ont été élaborées afin d'observer le comportement des protéines soumises à des traitements thermiques (Relkin, 1996; Chan, 1983). La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est un outil important en analyse thermique alimentaire qui peut nous permettre d'observer l'influence de la présence de substances en solution, comme le sel ou des polysaccharides, sur la stabilité thermique de protéines de lactosérum (Ma *et al.*, 1990). En fait, il est possible d'étudier les changements au niveau de la température et de

l'enthalpie de dénaturation des protéines du lactosérum selon les différentes conditions en solution (Ma *et al.*, 1990).

L'effet de polysaccharides sur le comportement de protéines, en solution, en gel ou en émulsion, a fait l'objet de nombreuses études, étant donné le grand nombre d'applications possibles de ces systèmes (Dickinson, 1993). En solution, les mélanges protéines-polysaccharides donnent des systèmes co-solubles, incompatibles, ou complexés (Tolstoguzov, 1986). La formation de différents systèmes est due aux caractéristiques structurales des polymères (leurs poids moléculaires, la présence de groupements hydrophobes sur les molécules et la charge des polymères). En général, il est possible de visualiser le comportement de ces systèmes à l'aide de diagrammes de phases. Le type de système formé est de plus, grandement influencé par le pH, la température, la force ionique de la solution de même que la concentration des divers polymères (Ledward, 1994; Tolstoguzov, 1986).

Malgré de nombreuses études portant sur les protéines du lactosérum, leur comportement en solution est encore difficile à prédire puisqu'il varie significativement selon les autres substances présentes dans son environnement. Cette étude vise à étudier la stabilité thermique d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL) en présence de polysaccharides anioniques et à caractériser le comportement des systèmes IPL-dextrans en solution aqueuse de même que les interactions qui entrent en jeu dans ce type de systèmes protéines-polysaccharides. Pour ce, l'effet d'un polysaccharide anionique sur la stabilité thermique (température et enthalpie de dénaturation) d'une solution d'isolat de protéines de lactosérum (IPL) native et prétraitée a été étudié à l'aide de dextran sulfate et de NaCl à divers pH. Ensuite, l'ajout de différents dextrans à une solution d'IPL a permis d'étudier le comportement de ces protéines en solution selon les diverses charges électrostatiques que portent chacun de ces polymères. Pour ce faire, les diagrammes de phases IPL-dextran neutre et IPL-dextran sulfate, à pH 5,2 et 7,0 ont été élaborés.

3.3 Matériel et méthodes

3.3.1 Matériel

L'isolat de protéines de lactosérum (Bipro 95% de protéines) a été obtenu de la compagnie Davigo Foods Intl. Inc. (Le Sueur, Mn). Les dextrans neutre et sulfaté de poids moléculaire de 500KDa ont été achetés de la compagnie Dextran Products Limited, une division de Polydex Pharmaceuticals Limited (Scarborough, Ont., Canada). Les solutions d'acide (HCl), de base (NaOH) et de NaCl ont été obtenues chez Fisher Scientifique (Nepean, Ont., Canada).

3.3.2 Préparation des solutions de protéines natives et prétraitées

Une solution mère d'IPL, préparée à température ambiante dans de l'eau distillée à une concentration initiale de 25% (p/p) a été agitée pendant au moins une heure pour assurer une bonne hydratation des protéines. La solubilité des protéines à pH 4,6 a été utilisée par plusieurs chercheurs comme indice de l'étendue de la dénaturation des protéines de lactosérum (McDonough *et al.*, 1974; Guy *et al.*, 1967). Pour s'assurer de ne travailler qu'avec des protéines natives et solubles, les solutions ont été ajustées à pH 4,6 (HCl 3N) et les protéines dénaturées non solubles à ce pH ont été éliminées de la solution mère par centrifugation (10 000 g durant 30 minutes). Le surnageant récupéré a été centrifugé de nouveau (10 000 g, 30 minutes), puis le surnageant final, contenant les protéines du lactosérum soluble a été utilisé pour les expériences décrites ci-dessous. La solution d'IPL (c'est à dire le surnageant) a ensuite été séparée en plusieurs parties qui ont été ajustées à pH 5,2 ou 7,0 selon les conditions de l'expérience et utilisé nativement ou selon un prétraitement.

Prétraitement des solutions d'IPL

Un prétraitement thermique a été imposé à une partie de la solution d'IPL, ajustée à pH 7,0, durant 2 minutes à 70°C dans un bain-marie. Cette solution a été utilisée sans traitement supplémentaire afin de vérifier l'effet d'une dénaturation thermique partielle (avant assemblage des mélanges) sur la température et l'enthalpie de dénaturation de l'IPL et sur son comportement en solution.

Caractérisation des solutions de protéines

Pour s'assurer que la solution de protéines récupérée était représentative de celle de l'isolat initial, le surnageant et le culot obtenus après centrifugation ont été analysés par RP-HPLC (voir méthode, Annexe A). L'analyse a démontré que les deux fractions sont composées d'une même proportion des différentes protéines du lactosérum (β -lactoglobuline, α -lactalbumine et sérum-albumine bovine). La quantité de protéines récupérées dans le surnageant des différentes solutions mères a varié entre 20 et 22% (évaluée par dosage d'azote, selon la méthode Kjeldahl). La concentration protéique de toutes les solutions a été évaluée approximativement à 20% pour l'établissement des diagrammes de phases et la calorimétrie.

3.3.3 Préparation des solutions de polysaccharides

Les solutions de dextran et dextran sulfate (25% p/p) ont été préparées à température ambiante dans de l'eau distillée, sous forte agitation pendant au moins 1 heure pour assurer une bonne hydratation des molécules de dextran. Les solutions de polysaccharidés à pH 5,2 et 7,0, avec ou sans sel (0,5M NaCl) étaient toutes claires et ne démontraient aucun précipité après centrifugation (10 000g, 30 minutes).

3.3.4 Préparation des mélanges protéines-polysaccharides

Les différentes solutions de protéines et de polysaccharides ont été assemblées en mélanges de diverses concentrations : 5 ou 10% de protéines et 1, 5, 10% de dextran sulfate à pH 5,2 ou 7,0 en présence ou absence de sel (0,5M NaCl). Dans le cas des solutions de protéines prétraitées thermiquement, les mélanges obtenus contenaient 5% de protéines et 1, 2, 5 ou 7,5% de dextran sulfate à pH 7,0 en présence ou absence de sel (0,5M NaCl). Les mélanges ont été agités pendant une heure afin d'assurer leur uniformité.

3.3.5 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les pics endothermiques de dénaturation des protéines de lactosérum ont été observés par DSC. La température de dénaturation (T_d) des échantillons a été évaluée à la hauteur maximale du pic endothermique du thermogramme alors que l'enthalpie (ΔH) a été déterminée à partir de l'aire sous la courbe de ce pic (Ma *et al.*, 1990). Des échantillons d'environ 10 μ L ont été pesés dans des cupules d'aluminium (Westech Industrial Ltd, Ontario). Une fois scellées hermétiquement, les cupules ont été chauffées de 25°C à 100°C à une vitesse de 5°C/min à l'aide d'un calorimètre différentiel à balayage Pyris 2 de Perkin Elmer (Markham, Ont.). Une cupule vide a été utilisée comme référence et le calibrage de l'appareil fait à l'aide d'un standard à l'indium (Boye *et al.*, 1996). Tous les échantillons ont été analysés en duplicata.

3.3.6 Élaboration des diagrammes de phases

Les diagrammes de phases ont été élaborés à partir des caractéristiques visuelles des solutions. Les différents mélanges IPL-dextran (0 à 15% de protéines et 0 à 15% de polysaccharides) ont été agités (1h) et centrifugés à 10 000 g pendant 30 minutes. Les mélanges ont ensuite été évalués selon les critères suivant : **clair**, lorsqu'il était possible et facile de voir au travers de la solution, **trouble**, lorsqu'il était difficile de voir au travers, et **opaque** lorsqu'il n'était pas possible de voir au travers. Le nombre de phases du système a été évalué selon que la séparation de phases était évidente ou non. Puisque les solutions d'IPL seul et de dextran seul sont toutes les deux claires, la présence de turbidité est causée par des interactions entre les protéines et les dextrans du système (Michon *et al.*, 1996).

Dosage des phases

Lorsqu'il s'est produit une séparation de phase, la composition en protéines et en polysaccharides des deux phases a été analysée en duplicata par la méthode de Kjeldahl (FIL, 1993) et la méthode phénol sulfurique respectivement (Chaplin, 1986). Le facteur de conversion de l'azote utilisé était de 6,38 (FIL, 1993).

3.4 Résultats et discussion

A) Calorimétrie

3.4.1 Températures et enthalpies de dénaturation du système natif

Les thermogrammes obtenus n'ont démontré qu'un seul pic de dénaturation pour toutes les conditions étudiées (Figure 3.1 à 3.3). Ce pic correspond au pic de dénaturation de la β -lactoglobuline, protéine qui constitue plus de 50% de l'IPL (Bernal et Jelen, 1985; Morr et Foegeding, 1990). Les températures de dénaturation (T_d) qui se trouvent aux tableaux 3.1, 3.2 et 3.4, correspondent à la hauteur maximale du pic du thermogramme obtenu.

Les valeurs de température de dénaturation (T_d) obtenues pour les solutions d'IPL seul (Tableau 3.1) sont semblables à celles obtenues par Bernal et Jelen (1985) pour un concentré de protéines de lactosérum (solution à 10%) à pH 5,5 (78,8°C) et pH 6,5 (76,9°C) ainsi que celles obtenues par Boye *et al.* (1996) pour des solutions de β -lactoglobuline (concentrée à 20%) à pH 5 (82°C) et pH 7 (73°C). Comme il a déjà été observé par de Wit et Klarenbeek (1981), les valeurs de T_d sont dépendantes du pH des solutions et sont moins élevées à pH neutre qu'à pH acide (près du pI). À pH neutre, la réactivité des groupements thiols libres serait plus élevée et les protéines s'agrègeraient plus rapidement lors du traitement thermique.

L'augmentation de la concentration en protéines a généralement pour effet de diminuer la T_d . Puisque qu'il y a moins de solvant disponible, les protéines peuvent s'agréger plus rapidement qu'à faible concentration. Cette diminution n'est remarquée qu'à pH 7,0. À pH 5,2, l'effet est moins marqué, puisqu'il y a un plus grand nombre d'interactions hydrophobes intramoléculaires présentes au pI des protéines (Relkin, 1994; Kinsella & Whitehead, 1989). Lorsque ce type d'interaction est favorisé, la structure moléculaire est plus stable et il y a parfois peu de différence entre certaines observations, comme c'est le cas lors de l'augmentation de la concentration de l'IPL seul de 5% à 10%.

La figure 3.1 qui présente les thermogrammes de solution d'IPL (10%) à pH 7,0 en absence et en présence de 0,5M de NaCl, montre que la présence de sel en solution influence le thermogramme et augmente la Td de l'IPL. En fait aux deux pH étudiés, l'ajout de 0,5M de NaCl a pour effet d'augmenter la Td (Tableau 3.1), car celui-ci contribue à augmenter la stabilité structurale de la protéine en réduisant son agrégation thermique (Relkin, 1996; Boye *et al.*, 1996). L'effet du sel (NaCl) sur la température de dénaturation des protéines de lactosérum a aussi été étudié par Boye *et al.* (1996) à l'aide de solutions de β -lactoglobuline. Ces chercheurs ont observé une augmentation plus importante de la température de dénaturation de solutions de β -lactoglobuline avec des concentrations élevées en sel (Td=79,5°C pour 0,5M de NaCl et Td= 85,2°C pour 2,0M de NaCl).

Des travaux préliminaires ont démontré un effet déstabilisateur ou bien aucun effet sur la stabilité thermique de l'IPL lors de la présence de dextran neutre en solution. Les systèmes IPL-dextran neutre n'ont donc pas été étudiés en détail par calorimétrie. Cependant, l'ajout de dextran sulfate (DS) a pour effet d'augmenter la Td de plusieurs degrés Celsius (Tableau 3.1). Cet effet n'est pas proportionnel à la concentration en polysaccharides puisque l'ajout de très grande quantité de dextran sulfate (10%) ne cause pas d'augmentation aussi importante de la Td que l'ajout de 1% de ce polysaccharide. Par exemple à pH 5,2, il y a une augmentation de 7,5°C avec 10% de DS, la Td passant de 77,6°C à 85,1°C comparativement à une augmentation de 5,7°C avec 1% de DS (de 77,6 °C à 83,3 °C). Bernal et Jelen (1985) ainsi que Boye *et al.* (1996) ont démontré un effet protecteur similaire lors de l'ajout de différents saccharides (glucose, lactose ou sucrose) à des solutions de protéines de lactosérum. Comme pour les saccharides, l'augmentation de la Td en présence de polysaccharides peut s'expliquer par une plus grande organisation des molécules d'eau autour des molécules de protéines qui maintient ou même augmente leur hydratation. Cette structure protège les protéines contre la dénaturation thermique, ralentit leur déploiement et leur tendance à l'agrégation (Bull et Bresse, 1978).

Toutefois, d'autres auteurs n'ont pas remarqué d'effet protecteur lors de traitement thermique de protéines de lactosérum en présence de dextran sulfate ou de carraghénane. En fait, Galazka *et al.* (1996, 1999) ont observé que l'ajout de dextran sulfate (2,5%) à une solution

de β -lactoglobuline (2,5%) n'a apporté aucune différence significative à la Td (73,3°C sans polysaccharide contre 73,6°C en présence de polysaccharides). De plus, ils ont observé que l'ajout de ι -carraghénane et de κ -carraghénane (0,2%) faisait diminuer la température et l'enthalpie de dénaturation de solutions de BSA (0,5%) aux valeurs suivantes : 69,0°C et 68,5°C en présence de carraghénane, contre 70,5°C sans polysaccharide.

Les températures de dénaturation des protéines de lactosérum en présence de divers polysaccharides ont été étudiées (Tableau 3.2) et semblent varier selon le type de polysaccharide. Contrairement aux résultats de Galazka *et al.* (1996, 1999) mentionné plus haut, nous avons observé que la température de dénaturation de l'IPL augmentait en présence de carraghénane. Toutefois, cette augmentation est moins marquée qu'à l'ajout de dextran sulfate (Tableau 3.2). Tout comme le dextran sulfate, les ι -carraghénane et κ -carraghénane sont des polysaccharides sulfatés. Toutefois, leur effet sur les protéines de lactosérum peut être différent (Tableau 3.2) puisque le nombre de groupements sulfatés que contiennent les carraghénanes est inférieur à celui du dextran sulfate et varie selon l'ordre suivant : κ -carraghénane < ι -carraghénane < dextran sulfate (Galazka *et al.*, 1996). La charge totale négative des carraghénanes est donc moins élevée que celle du dextran sulfate ce qui pourrait expliquer le peu d'effet qu'ils ont sur la température de dénaturation de la β -lactoglobuline.

La comparaison est aussi possible avec un polysaccharide non sulfaté comme le xanthane. Ce polysaccharide anionique de haut poids moléculaire porte plusieurs charges négatives étant donné les nombreux groupements d'acide pyruvique situés le long de sa chaîne carbonnée. Comme pour le dextran sulfate et les carraghénanes, l'ajout de xanthane a eu pour effet d'augmenter la Td de l'IPL de plusieurs degrés (Tableau 3.2). Plusieurs facteurs peuvent donc influencer la capacité d'un polysaccharide à modifier la Td d'un IPL tels que sa nature, son poids moléculaire et sa charge. D'ailleurs, Barbeau (1995), a démontré que des molécules chargées négativement comme des peptides, peuvent protéger la β -lactoglobuline de la dénaturation thermique à des pH neutres ou alcalins en créant une répulsion électrostatique qui force les protéines à se replier sur elles-mêmes en une structure plus compacte et moins susceptible au déploiement thermique.

La figure 3.2 démontre que la présence de dextran sulfate ou de dextran sulfate et de sel simultanément en solution influence le thermogramme et augmente la Td de l'IPL. Toutefois, les valeurs de Td obtenues lors de l'ajout simultané de dextran sulfate et de 0,5M (Tableau 3.1) sont semblables à celles observées lors de l'ajout de sel seul. L'effet du sel semble prédominer sur celui du dextran sulfate. En fait, l'ajout de quantités de plus en plus grandes de dextran sulfate provoque une augmentation de moins en moins importante de la Td à pH 7,0. Les valeurs obtenues en présence de 10% de dextran sulfate et de sel sont même inférieures à celle de l'IPL en présence de sel seulement. Cet effet peut être expliqué par une trop grande quantité de polymères en solution qui mène à une compétition pour le solvant (effet de «salting-out»). Les valeurs obtenues sont toutefois supérieures à celles où l'IPL est seul, ce qui signifie qu'un effet protecteur causé par le sel est toujours présent. Une protection maximale des protéines du lactosérum en présence de 0,5% de NaCl serait donc atteinte lorsque la concentration en dextran sulfate est inférieure à 5%.

Enthalpies de dénaturation du système natif

Les enthalpies de dénaturation (ΔH) de l'IPL obtenues sous différentes conditions sont présentées au Tableau 3.3. Elles correspondent à l'intégration de l'aire sous la courbe du pic d'un thermogramme et représentent un bon estimé de l'énergie thermique nécessaire pour dénaturer les protéines (Barbeau *et al.*, 1996). Les valeurs d'enthalpie obtenues pour l'IPL seul sont en accord avec les résultats de plusieurs auteurs. En effet, de Wit et Klarenbeek (1981) ont observé une valeur de 3,5 J/g pour une solution de 10% de β -lactoglobuline à pH 7,0 et Barbeau (1995) a observé une enthalpie de dénaturation de 9,49 J/g à pH 5,1 et de 6,30 J/g à pH 7,5 pour des solutions de β -lactoglobuline à 17%.

En général, lorsque les enthalpies de dénaturation des mélanges sont comparées à celles obtenues pour l'IPL natif seul (Tableau 3.3), elles ne changent pas ou n'augmentent que légèrement. Lorsque la concentration de l'IPL augmente de 5 à 10%, l'enthalpie de dénaturation ne change pas, que l'IPL soit seul, en présence de sel ou de dextran sulfate. Néanmoins, plusieurs auteurs rapportent qu'une baisse de l'enthalpie survient lors de l'augmentation de la concentration en protéines (Relkin et Launay, 1990; Harwalkar et

Kalab, 1985). Nos résultats ne confirment pas cette tendance mais il y a encore peu de données disponibles sur ce sujet.

L'enthalpie est plus élevée à pH 5,2 (pI) qu'à pH 7 (Tableau 3.3). De plus, l'ajout de sel augmente légèrement l'enthalpie et ce, aux deux pH et à toutes les concentrations étudiées (Tableau 3.3). Ces résultats concordent avec ceux de Relkin (1996), qui a aussi observé, pour des solutions d'isolat de β -lactoglobuline (5%), diverses variations de l'enthalpie lors de l'ajout de sel (NaCl: 0 à 0,8 M) et une augmentation générale de celle-ci lorsque le pH était acide (pH 3,5 contre pH 7,0).

Les variations de l'enthalpie lors de l'ajout de sel peuvent s'expliquer par la contribution du sel qui augmente la stabilité structurale des protéines en réduisant leur tendance à l'agrégation thermique (Relkin, 1996; Boye *et al.*, 1996). Ceci se traduirait par une augmentation de l'enthalpie et serait observable sur un thermogramme par un pic plus défini, plus élevé et ayant une plus grande aire (Figure 3.1). Cependant, certains auteurs ont stipulé que la présence de sel pourrait aussi contribuer à une baisse de la variation de l'enthalpie totale de dénaturation et l'ont attribué à l'augmentation des interactions hydrophobes qui sont exothermiques (Relkin 1996; Relkin et Launay, 1990; Harwalkar et Kalab, 1985).

L'ajout de dextran sulfate en faible concentration (1%) ne change pas l'enthalpie de dénaturation mais l'ajout d'une grande quantité (5% ou 10%) fait généralement augmenter celle-ci peu importe le pH ou la concentration en protéines (Tableau 3.3). Jou et Harper (1996) ont observé que l'ajout de différents disaccharides n'apportait pas de changements significatifs à l'enthalpie d'un concentré de protéines de lactosérum. Toutefois, Galazka *et al.* (1999) ont remarqué que l'ajout de ι -carraghénane et de κ -carraghénane en faible concentration (0,2%) faisait diminuer l'enthalpie de dénaturation de solutions de BSA d'une valeur de $17,5 \times 10^4$ Kcal/mol sans polysaccharides, contre $14,1 \times 10^4$ Kcal/mol et $13,3 \times 10^4$ Kcal/mol en présence de ces carraghénanes.

Il est possible que la concentration de polysaccharide ajoutée influence grandement la réponse de l'enthalpie puisque l'ajout de 0,5% de κ -carraghénane à une solution de 5% d'IPL

natif (Tableau 3.2) amène une augmentation de l'enthalpie de dénaturation de 3,2 J/g pour l'IPL seul (5%) à 5,1 J/g pour l'IPL en présence de κ -carraghénane. Cette augmentation est contraire aux résultats de Galazka *et al.* (1999) qui ont observé une diminution de l'enthalpie de solution de BSA en présence de 0,2% de ce même polysaccharide. Comme pour la température de dénaturation, l'augmentation de l'enthalpie est moins marquée à l'ajout de κ -carraghénane qu'à l'ajout de dextran sulfate.

L'augmentation de l'enthalpie de dénaturation de l'IPL lors de la présence de grandes quantités de dextran sulfate pourrait s'expliquer par une plus grande organisation des molécules d'eau autour des molécules de protéines qui maintiennent ou augmentent leur hydratation. Cette structure protège les protéines, contre la dénaturation thermique, ralentit leur déploiement et leur tendance à l'agrégation (Bull et Bresse, 1978). Ceci ferait varier la quantité d'énergie requise pour dénaturer la protéine et s'exprimerait par un temps de dénaturation plus long et par une plus grande aire sous le pic de thermogramme (Figure 3.2), desquels résultent une température et une enthalpie de dénaturation plus élevés.

L'effet de différents carraghénanes a aussi été étudié sur la température et l'enthalpie de dénaturation de protéines extraites de viandes de porcs (de protéines myofibrillaires et d'une fraction protéique soluble en solution saline) (Zoraida, 1994). Une augmentation de l'enthalpie de dénaturation de protéines de viandes a été remarquée lors de l'ajout de carraghénane. Lorsque les mélanges étaient en présence d'une force ionique faible (0,18M), l'augmentation de l'enthalpie était un peu plus élevée lors de l'ajout de κ -carraghénane, comparativement à celle de ι -carraghénane. Par contre, lorsque la force ionique est plus élevée (0,52M) l'enthalpie est plus élevée lors de l'ajout de ι -carraghénane. Ceci indique donc que la force ionique influence aussi l'effet qu'aura un polysaccharide sur une protéine (Zoraida, 1994).

Une légère augmentation est observée entre les valeurs d'enthalpie obtenues pour l'IPL seul et celles obtenues pour l'IPL en présence de sel et de dextran sulfate simultanément (Tableau 3.3). Les valeurs atteintes correspondent aux valeurs obtenues pour l'IPL avec sel. Tel que constaté pour la Td, l'effet du sel semble prédominer sur celui du dextran sulfate. Il est fort

probable que l'augmentation soit causée par la présence de sel seulement qui augmente la stabilité structurale des protéines en réduisant leur tendance à l'agrégation thermique (Relkin, 1996; Boye *et al.*, 1996).

3.4.2 Températures et enthalpies de dénaturation du système prétraité en comparaison au système natif

Les thermogrammes obtenus lors de la dénaturation d'échantillons d'IPL prétraité n'ont montré qu'un seul pic de dénaturation pour toutes les conditions étudiées (Figure 3.3). Toutefois, ce pic était moins bien défini, c'est-à-dire plus étendu et moins élevé qu'avec les échantillons d'IPL natif. Le prétraitement appliqué (2 min à 70°C) peut avoir affecté la structure tertiaire des protéines, même si celles-ci sont demeurées solubles (Relkin, 1994). L'analyse de la température et de l'enthalpie de dénaturation de l'IPL prétraité n'a été réalisée qu'à un seul pH (pH 7,0), puisque à pH 5,2 (pI) les interactions protéines-protéines étaient élevées et les solutions gélifiaient à froid sous les conditions du prétraitement thermique. Les résultats obtenus dans le cas des systèmes où l'IPL a subi un traitement thermique préalable au mélange des solutions figurent au tableau 3.4 et seront comparés à ceux des systèmes où l'IPL est natif (section 3.4.1; Tableau 3.1 et 3.3).

En général, à pH 7,0, la Td du système natif est moins élevée que celles du système où l'IPL est prétraité (74,8°C contre 76,3°C) (Tableau 3.1 et 3.4). L'augmentation de la Td peut s'expliquer par le fait que les protéines de l'IPL prétraité sont plus déployées que celles de l'IPL natif mettant à jour des groupements préalablement cachés à l'intérieur de leur molécule (Gotham *et al.*, 1992). En fait, de Wit (1981) mentionne que lorsque la β -lactoglobuline est chauffée entre 55 et 70°C, plusieurs liaisons covalentes sont rompues ce qui entraînerait un déploiement partiel de la structure tertiaire de la protéine. Cette structure moins organisée offrirait une plus grande liberté rotationnelle à la molécule (Yon, 1969) permettant un renforcement des interactions hydrophobes entre les résidus apolaires et par le même fait, minimiserait leurs interactions avec le solvant (Wright 1982; Myers, 1990). Ce renforcement des interactions hydrophobes viendrait donc stabiliser la structure moléculaire des protéines de l'IPL prétraité, ce qui se traduirait par une augmentation de la Td de dénaturation de celles-ci. De plus, d'après Harwalkar et Kalab, (1985) plus la proportion de

résidus non polaires exposée est élevée, plus la stabilité à la dénaturation thermique de la β -lactoglobuline est grande.

Ces résultats sont différents de ceux de Kristensen *et al.*, (1997) qui ont aussi étudié l'effet d'un prétraitement thermique à 55°C d'une solution de β -lactoglobuline (5%) à pH 7 en présence de 1% de NaCl. Dans cette étude, les auteurs n'ont observé aucun changement significatif dans la Td ou de l'enthalpie de dénaturation de la protéine comparativement aux valeurs obtenues sans prétraitement. Ceci s'explique par la température beaucoup plus faible de leur prétraitement (55°C) comparativement à celle appliquée aux solutions d'IPL étudiées (70°C). La structure des protéines est beaucoup moins affectée par ce prétraitement, puisque les changements majeurs de conformation se produisent surtout à des températures supérieures à 60°C (Galani et Owusu, 1996; Relkin, 1994).

L'ajout de sel augmente la Td de l'IPL prétraité (de 76,3 °C à 83,3 °C) (Tableau 3.4) et ce de façon plus importante que pour l'IPL natif (de 74,8 °C à 82,5°C) (Tableau 3.1). Cette augmentation pourrait aussi s'expliquer par le fait qu'un plus grand nombre d'interactions intramoléculaires sont favorisées à l'aide d'ions Na⁺ résultant en une meilleure stabilisation de la structure des protéines et une diminution de sa tendance à l'agrégation thermique (Relkin, 1996; Boye *et al.*, 1996).

L'ajout de dextran sulfate augmente aussi la Td de l'IPL prétraité et ce, de façon plus importante que pour l'IPL natif en présence du même polysaccharide. Dans les deux systèmes, l'ajout de concentrations de dextran sulfate plus élevées n'augmente pas davantage la Td. Il semblerait donc que de faibles quantités de ce polysaccharide soient suffisantes pour faire augmenter significativement la Td de l'IPL.

Tel qu'observé avec les systèmes où l'IPL est natif, l'ajout simultané de dextran sulfate et de sel apporte des Td similaires à celles obtenues lors de l'ajout de sel seul. De plus, l'augmentation progressive de la concentration en dextran sulfate n'apporte pas de changement significatif à la Td si ce n'est qu'une légère baisse de celle-ci qui peut s'expliquer par une trop grande quantité de polymères en solution qui provoque une

compétition pour le solvant et un effet de «salting-out» (Grinberg et Tolstoguzov, 1997). Cet effet amènerait les protéines à s'associer et elles auraient tendance à s'agréger rapidement, ce qui se traduirait par une diminution de la Td.

Enthalpies de dénaturation du système prétraité

La comparaison des valeurs d'enthalpie du système natif avec celles du système prétraité, montre en général peu de changements, sinon une légère diminution pour l'IPL ayant subi un prétraitement, qu'il soit seul, en présence de sel ou de dextran sulfate (Tableau 3.3 et 3.4). Cette enthalpie plus faible peut s'expliquer par le fait que la structure de la protéine a été déployée par le prétraitement thermique et qu'elle nécessite donc moins d'énergie pour réaliser le déploiement de la structure résiduelle (durant l'analyse par calorimétrie).

L'ajout de 1% de dextran sulfate ne crée pas vraiment de différence notable entre les valeurs d'enthalpie des systèmes prétraité ou natif. Toutefois, lors de l'ajout de concentrations supérieures (5%), une baisse de l'enthalpie est notée. D'une part, il est possible qu'une trop grande quantité de polymères en solution provoque une compétition pour le solvant et un effet de «salting-out». Cet effet pousserait les protéines à s'associer, les portant ainsi à s'agréger plus rapidement, ce qui amènerait une diminution de l'enthalpie (Grinberg et Tolstoguzov, 1997). D'autre part, la structure des protéines prétraitées est plus déployée et révèle de nombreux groupements hydrophobes qui étaient préalablement cachés à l'intérieur de celles-ci. Ces groupements tendent aussi à favoriser l'agrégation entre les protéines. De même, il est possible que le nombre d'interactions hydrophobes intramoléculaires augmente ce qui se traduirait par une diminution de l'enthalpie puisque celles-ci sont de nature exothermique (Relkin, 1994; Kinsella & Whitehead, 1989).

L'effet de «salting-out» devrait être de plus en plus visible avec l'augmentation de la concentration en polysaccharides ou lors de l'ajout de sel. D'ailleurs, lors de l'ajout simultané de sel et de dextran sulfate, une augmentation moins marquée de l'enthalpie est généralement observée pour les systèmes prétraités (Tableau 3.4), probablement en raison du nombre croissant d'interactions hydrophobes se produisant en présence d'une structure plus déployée et de sel.

B) Diagrammes de phases

L'élaboration des diagrammes de phases permet d'étudier le comportement en solution de mélanges de polymères. Le comportement de différents systèmes IPL-dextran sulfate et IPL-dextran neutre a donc été observé visuellement et caractérisé comme étant compatible ou incompatible selon les différentes concentrations d'IPL, pH des solutions et la nature des polysaccharides.

3.4.3 Système IPL-dextran sulfate

Les mélanges IPL natif-dextran sulfate à pH 5,2 et 7,0 se sont tous révélés clairs et homogènes (compatibles) pour toutes les concentrations étudiées (0 à 15% IPL, 0 à 15% dextran sulfate). Il est possible que le seuil de concentration critique où une incompatibilité survienne n'ait pas été atteint. Syrbe (1997) a d'ailleurs démontré la compatibilité des protéines du lactosérum natives en présence de divers polysaccharides anioniques. En général, ces systèmes ne montrent pas d'incompatibilité à moins d'être soumis à un traitement thermique ou à de hautes pressions (Syrbe, 1997).

En présence de sel, à pH 5,2 (pI), l'élaboration d'un diagramme de phases est plutôt difficile car, les protéines du lactosérum précipitent. Cette précipitation est due à la grande force ionique présente : l'eau étant devenue un moins bon solvant, les interactions protéines-protéines augmentent et une partie de celles-ci deviennent insolubles surtout au pI où les interactions protéines-protéines sont déjà favorisées (Grinberg et Tolstoguzov, 1997).

À pH 7,0, l'ajout de sel à ce système conduit à l'obtention d'une zone d'incompatibilité avec séparation de phases (Figure 3.4). La présence de force ionique élevée, minimise les interactions électrostatiques entre les groupements chargés des protéines et des polysaccharides et favorise les interactions polymères-polymères de même nature (Tolstoguzov, 1991). Les interactions polysaccharides-solvant et protéines-solvant diminuent donc en faveur des interactions polysaccharides-polysaccharides et protéines-protéines, ce qui entraîne l'incompatibilité avec séparation de phases. Ces résultats concordent avec ceux

de plusieurs auteurs qui ont observé que les mélanges protéines-polysaccharides anioniques ne montraient pas d'incompatibilité, à moins d'être en présence d'une force ionique élevée (plus de 0,2 M de NaCl) (Antonov *et al.*, 1979; Tolstoguzov, 1991).

La zone d'incompatibilité de ce système correspond aux conditions découlant d'une diminution de la Td, c'est-à-dire, à des concentrations élevées en polymères et une grande force ionique. Il semble que l'augmentation des interactions protéines-protéines favorise la dénaturation puisqu'il se produit un effet de concentration des protéines amenant une augmentation des interactions hydrophobes et une Td plus faible (Relkin, 1994; Kinsella et Whitehead, 1989). De plus, il est possible que l'augmentation des interactions polysaccharides-polysaccharides diminue ou empêche la formation d'une structure stabilisatrice avec l'eau. Ainsi le dextran sulfate ne contribue plus à la protection des molécules de protéines. Ceci pourrait expliquer la faible augmentation de la Td en présence de grande quantité de polysaccharide (Tableau 3.1).

Système prétraité IPL-dextran sulfate

Une incompatibilité a aussi été notée avec des mélanges IPL prétraité-dextran sulfate. Cependant, c'est par une augmentation de la turbidité et non par une séparation en deux phases distinctes que celle-ci s'est manifestée (Figure 3.5). Cette augmentation de turbidité correspond aussi à une séparation de phases. D'après Syrbe *et al.* (1995), lorsque les phases d'une solution de polymère incompatible sont soumises à une agitation, celles-ci se comportent comme de l'huile et de l'eau, c'est-à-dire qu'elles forment une émulsion instable. Selon Michon *et al.* (2000), il est possible que la turbidité des mélanges s'explique partiellement par une haute concentration en polymères qui provoque une augmentation de la viscosité des mélanges. Les phases macroscopiques de ces mélanges auraient alors de la difficulté à se séparer étant donné la présence de cette haute viscosité. Toutefois, après centrifugation, les mélanges demeurent toujours troubles ce qui indique que la viscosité n'est pas la seule responsable de la turbidité des mélanges (Michon *et al.*, 2000). Un comportement semblable a été obtenu par Michon *et al.* (2000) avec des mélanges gélatine-iota-carraghénane à pH 7. D'autres auteurs ont aussi observé une incompatibilité pour des systèmes contenant des protéines du lactosérum prétraitées en présence de polysaccharides

anioniques, telle la κ -carraghénane à pH 7. Néanmoins, c'est par une séparation de phases que l'incompatibilité s'est manifestée et non par augmentation de la turbidimétrie (Syrbe *et al.*, 1995).

Contrairement au système natif, les résultats calorimétriques (Tableau 3.4) n'ont pas révélé de différence au niveau des températures ou des enthalpies de dénaturation observées entre les mélanges de ce système prétraité qu'ils soient en zone d'incompatibilité ou non (Figure 3.5). En fait, l'ajout de concentrations croissantes de dextran sulfate n'apportait pas de changement de Td supérieur à l'ajout de seulement 1% de ce polysaccharide.

Ce diagramme n'a pas été réalisé en présence de sel car les protéines de la solution d'IPL précipiteraient en raison du grand nombre d'interactions protéines-protéines. Néanmoins, une incompatibilité plus prononcée serait fort probable dans un tel système puisque le sel provoquerait une augmentation des interactions hydrophobes typiques d'un effet de «salting-out» (Grinberg et Tolstoguzov, 1997). De plus, ces interactions seraient déjà très présentes puisque la structure déployée des protéines prétraitées révèle un nombre important de groupements hydrophobes préalablement cachés à l'intérieur de celle-ci. Cette augmentation des interactions hydrophobes expliquerait la diminution de la Td d'un degré Celsius lors de l'ajout de sel et dextran sulfate simultanément, comparativement à l'usage de sel seul (Tableau 3.4).

3.4.5 Système IPL-dextran neutre

Les mêmes systèmes ont été étudiés avec du dextran neutre afin de vérifier l'effet d'un polysaccharide neutre sur le comportement en solution des protéines du lactosérum. Une incompatibilité a été observée tant à pH 5,2 (séparation de phases) qu'à pH 7 (turbidité) pour les mélanges IPL-dextran neutre (Figure 3.6 et 3.7). Le système à pH 5,2 révèle une incompatibilité lorsque la concentration en dextran augmente au-delà de 4%, résultant en une séparation de phases (Figure 3.6). La majorité, voire la totalité, des polysaccharides se retrouve dans la phase supérieure de la solution avec une grande partie du solvant alors que les protéines concentrées se retrouvent dans la phase inférieure avec très peu de solvant. Ceci est premièrement dû au fait qu'à ce pH, les protéines sont à leur pI et, n'étant pas chargées,

elles interagissent beaucoup plus entre elles qu'avec le solvant et les autres constituants de la solution. Deuxièmement, le dextran neutre a la particularité d'exclure les autres polymères de son milieu et de s'accaparer la majorité du solvant grâce à sa structure particulièrement hydrophile.

D'après Syrbe (1997), ce genre d'incompatibilité avec séparation de phases est observé dans plusieurs systèmes contenant des protéines du lactosérum et des polysaccharides neutres, surtout lorsque le pH se situe autour du pI des protéines (généralement entre 4,5 et 6) (Syrbe, 1997). En fait, plus le pH est près du pI, plus la force ionique est faible et plus le polysaccharide anionique prend du volume. C'est pourquoi la séparation de phases est généralement plus prononcée lorsque le pH du système se rapproche du pI.

Le même système IPL-dextran neutre, mais à pH 7, ne montrait pas de séparation de phases mais une turbidité lorsque les concentrations en polymère devenaient trop élevées dans la solution (Figure 3.7). On observe que les mélanges situés sous la ligne pointillée donnent des solutions mixtes claires, sans particules en solution et sans précipitation, mais que celles sur la ligne pointillée sont troubles et celles au-delà de la ligne sont complètement opaques sans toutefois montrer de séparation de phases ou de précipité après centrifugation. Il est possible qu'il n'y ait pas de séparation de phases parce qu'à pH 7, les protéines sont chargées négativement et ont plutôt tendance à se repousser mutuellement qu'à s'associer (Grinberg et Tolstoguzov, 1997). Elles interagissent plus avec le solvant, deviennent de meilleurs compétiteurs pour celui-ci et ne laissent donc pas le dextran neutre les exclure du milieu aqueux aussi facilement qu'à pH 5,2.

Des travaux préliminaires, réalisés en calorimétrie, ont démontré que l'ajout de dextran neutre n'avait aucun effet sur la stabilité thermique de l'IPL ou avait un effet déstabilisateur qui se manifestait par une diminution de la Td de l'IPL. La zone d'incompatibilité des systèmes IPL-dextran neutre à pH 5,2 et 7,0 correspond aux diminutions de Td de l'IPL tandis que la zone de compatibilité, c'est-à-dire là où la concentration en polymères est sous le seuil critique de séparation de phases ou de turbidité, correspond aux Td qui ne montrent pas de différences avec celles de l'IPL seul.

Système prétraité IPL-dextran neutre

Contrairement au système natif, les mélanges réalisés à pH 7,0 avec des protéines qui ont subi un prétraitement thermique n'ont pas démontré d'incompatibilité en présence de dextran neutre. Ceci est en accord avec les observations de Syrbe *et al.*, (1995) qui ont étudié des systèmes semblables contenant des protéines du lactosérum prétraitées en présence de dextran (2000 KDa) et de méthyl-dextran. Il faut considérer que des concentrations plus faibles (0 à 8% de protéines) étaient utilisées afin d'éviter que la solution de protéines ne gélifie avant l'assemblage des mélanges. Il est possible que le seuil de concentration critique où une incompatibilité se manifesterait n'ait pas été atteint (Syrbe *et al.*, 1995). De plus, puisque les protéines ont subi un prétraitement, elles sont plus déployées et donc plus en contact avec leur solvant (Gotham *et al.*, 1992). Il est probable que ce système démontre une incompatibilité à des concentrations en dextran neutre encore plus élevées qu'avec le système où l'IPL est natif.

3.5 Conclusion

Cette étude nous a permis de vérifier que l'ajout de polysaccharides anioniques comme le dextran sulfate peut avoir un effet protecteur sur la stabilité thermique d'un IPL. De plus, le pH, la présence de NaCl et l'ajout de différentes concentrations de polysaccharides peut aussi influencer la température de dénaturation de l'IPL de plusieurs degrés Celsius.

La caractérisation des systèmes IPL-dextran neutre et IPL-dextran sulfate en solution aqueuse, à l'aide de diagrammes de phases, a révélé que la charge des polysaccharides et la force ionique du système influençaient grandement leur comportement et leur compatibilité. De plus, il a été observé que les zones d'incompatibilité des diagrammes de phases correspondaient généralement à des températures de dénaturation moins élevées en calorimétrie. Lors d'incompatibilité, les interactions entre polymères de même nature sont favorisées, réduisant l'effet protecteur du polysaccharide sur l'IPL. La compréhension du comportement des systèmes protéines-polysaccharides pourrait donc permettre de prédire la stabilité thermique de protéines en solution.

3.6 Références

- Antonov, Y. A., Losinskaya, N.V., Grinberg, V.Y., Dianova, V.T. et Tolstoguzov, V.B. (1979). Phase equilibria in water-protein-polysaccharide systems. *Colloid & Polymer Sci.*, 257, 1159-1171.
- Barbeau, J. (1995). Effet de fractions peptidiques sur la stabilité thermique de la β -lactoglobuline bovine. Mémoire de maîtrise, Université Laval, Québec, Canada.
- Barbeau, J., Gauthier, S.F. et Pouliot, Y. (1996). Thermal stabilization of β -lactoglobulin by whey peptide fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3939-3945.
- Bernal, V. et Jelen, P. (1985). Thermal stability of whey proteins: a calorimetric study. *J. Dairy Res.*, 68:2847-2852.
- Boye, J.I., Ismail, A.A. et Alli, I. (1996). Effects of physicochemical factors on the secondary structure of β -lactoglobulin. *J. Dairy Res.*, 63: 97-109.
- Bull, H.B. and Breese, K. (1978). Interaction of alcohols with proteins. *Biopolymers*, 17:2121-2131.
- Chan, E. L. (1983). Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. *J. Food Sci.*, 48: 47-56.
- Chaplin, M.F. (1986). Monosaccharides. Dans: *Carbohydrate Analysis. A practical approach.* Chaplin M.F. et Kennedy J.F., (ed.). IRL Press, Oxford, England. page 2.
- De Wit J.N. (1981). Structure and functional behaviour of whey proteins. *Neth. Milk Dairy J.*, 35: 47-64.
- De Wit, J.N. and Klarenbeek, G. (1981). A differential scanning calorimetric study of the thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 160°C. *J. Dairy Res.*, 48: 293-302.
- Dickinson, E. (1993). Protein-polysaccharide interaction in food colloids. Dans: *Food colloids and polymer : Stability & mechanical properties.* Dickinson, E. et Walstra, P.(ed.), Royal Chem Soc. Cambridge, U.K., pages 77-93.
- FIL (1993). Norme provisoire de LA FIL, 20B: Détermination de la teneur en azote.
- Galani, D. et Owusu, R.K. (1996). The effect of heat on whey proteins. *Food Sci. Technol Today* 10 (3) :163-168.
- Galazka, V.B., Summer, I.G. et Ledward D.A. (1996). Changes in protein-protein and protein-polysaccharide interactions induced by high pressure. *Food Chem.*, 57: 393-398.

- Galazka, V.B., Smith, D., Ledward D.A et Dickinson E. (1999). Complex of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high-pressure treatment. *Food Chem.*, 64: 303-310.
- Gekko, K. et Noguchi, H. (1978). Effects of ionic dextran derivatives on heat precipitation of protein. *J. Agric. Food Chem.*, 26 (6):1409-1414.
- Gotham, S.M., Fryer, P.J. and Pritchard A.M. (1992). β -lactoglobulin denaturation and aggregation reactions and fouling deposit formation: a DSC study. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 27: 313-327.
- Grinberg, V. Y. et Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocoll*, 11 (2):145-158.
- Guy, E.J., Bettel, H.E. et Pallansch, M.J. (1967). Denaturation of cottage cheese whey proteins by heat. *J. Dairy Sci.*, 50 :828-832.
- Harwalkar, V.R. et Kalab, M. (1985). Thermal denaturation and aggregation in solution. Electron microscopic study. *Milchwiss*, 40: 65-68.
- Imeson, A. (1997). Thickening and gelling agents for food, second edition. Imeson, A., (ed.) Blackie Academic & Professional, Chapman et Hall, London, England, 320 pages.
- Jou, K.D. et Harper, W.J. (1996). Effect of disaccharides on the thermal properties of whey proteins determined by differential scanning calorimetry (DSC). *Milchwiss*, 51(9):509-512.
- Kinsella, J. E., et Whitehead, D.M. (1989). Proteins in whey: chemical physical and functional properties. *Adv.Nutr. Res.*, 33: 343-425.
- Kristensen, A. Nylander, T. Paulsson, M. et Carlsson, A. (1997). Calorimetric studies of interactions between β -lactoglobulin and phospholipids in solutions. *Int. Dairy J.*, 7: 87-92.
- Ledward, D.A. (1994). Protein-polysaccharide interactions. Dans: Protein functionality in food systems, Hettiarachchy, S.N. et Zieger, G.R. (ed.), Marcel Dekker, New-York, pages 225-259.
- Léonil, J., Mollé, D., Gaucheron, F., Arpino, P., Guenot, P. et Maubois, J.-L. (1995). Analysis of major bovine milk proteins by on-line HPLC and electrospray ionization-mass spectrometry. *Le Lait*, 75: 193-210.
- Ma, C.-Y., Harwalkar, V.R. et Maurice, T.J. (1990). Instrumentation and techniques of thermal analysis in food research. Dans: Thermal analysis of foods, Harwalkar et Ma (ed.), Elsevier Applied Science, London et New York, 360 pages.

- McDonough, F.E., Hargove, R.E., Mattinngly, W.A., Posati, L.P., et Alford, J.A. (1974). Composition and properties of whey protein concentrates from ultrafiltration. *J. Dairy Sci.*, 57: 1438-1443.
- Michon, C., Cuvelier, G., Launay, B. & Parker, A. (1996). Viscoelastic behavior of gelatin/iota-carrageenan mixtures. *J. Chim Phys.*, 93: 828-836.
- Michon, C., Vigouroux, F., Boulenguer, P., Cuvilier, G. et Launay B. (2000). Gelation/iota-carrageenan interactions in non-gelling conditions. *Food Hydrocoll.*, 14: 203-208.
- Morr, C.V. et Foegeding, E.A. (1990). Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates : a status report. *Food Technol.*, 44: 100-112.
- Myers, C.D. (1990). Study of thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis. Dans: *Thermal analysis of foods*. Harwalkar V.R. et Ma C.Y. (1990). Elsevier Science Publishers, New-York, pages 16-50.
- Parris N. et Bagainski, M.A. (1991). A rapid method for the determination of whey protein denaturation. *J. Dairy Sci.*, 74 (1): 58-64.
- Pearce R.J. (1983). Analysis of whey by HPLC. *Australian J. Dairy Technol.*, 38(3):114-117.
- Relkin, P. (1994). Differential scanning calorimetry: a useful tool for studying protein denaturation. *Thermochimica Acta*, 246 : 371-386.
- Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Crit.Rev. Food Sci.Nut.*, 36(6): 565-601.
- Relkin, P. et Launay, B. (1990). Concentration effects on the kinetics of β -lactoglobulin heat denaturation : a differential scanning calorimetry study. *Food Hydrocoll.*, 4:19-32.
- Smithers, W.G., Ballard, J.F., Copeland, A.D., De Silva, K.J. Dionysius, D.A., Francis, F.L., Goddard, C., Grieve, P.A. McIntosh, G.H., Mitchell, I.R. Pearce, J. et Regester, G.O. (1996). New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 79:1454-1459.
- Syrbe, A. (1997). Polymer incompatibility in aqueous whey protein and polysaccharide solutions. Thèse de Doctorat. Université Technique de Munich, Munich, Allemagne.
- Syrbe, A., Fernandes, P.B., Dannenberg, F., Bauer W. and Klostermeyer, H. (1995). Whey Protein + Polysaccharide Mixtures : Polymer incompatibility and its application. Dans: *Food Macromolecules and Colloids*, Dickinson, E. et Lorient, D. (ed.), Special publication, No. 156, Royal Society of Chemistry, London, pages 328-339.

Tolstoguzov, V.B. (1986). Functional properties of proteins-polysaccharide mixtures, Dans: Functional properties of food macromolecules, Mitchell J.R. & Ledward D.A. (ed.), Elsevier, London, pages 385- 414.

Tolsotguzov, V.B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction (Review). Food Hydrocoll., 4(6): 429-468.

Wright D.J. (1982). Application of scanning calorimetry to the study of protein behaviour in foods: Dans: Developments in food proteins, B.J.F. Hudson (ed). Applied Science Publishers, London, pages 61-69.

Yon J. (1969). Énergétique de la transconformation et de la dénaturation des protéines. Dans: Structure et dynamique conformationnelle des protéines. Herman (ed), Paris, pages 252-291.

Zoraida, D. F. (1994). Carrageenans in meat systems, Ph.D. Iowa State university, 1994.

Tableau 3.1 : Températures de dénaturation d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL), en fonction du pH, de la concentration en protéines, de la concentration en dextran sulfate (DS) et de la présence de 0,5M de NaCl.

Conditions		Température de dénaturation (°C ± 0,5°C)							
		IPL seul	IPL + NaCl	IPL + DS (1%)	IPL + DS (5%)	IPL + DS (10%)	IPL + DS (1%) + NaCl	IPL + DS (5%) + NaCl	IPL + DS (10%) + NaCl
5,2	5	77,6	85,3	83,3	86,3	85,1	85,9	86,5	86,0
	10	77,8	84,1	82,7	84,5	85,3	85,2	85,8	85,8
7,0	5	74,8	82,5	77,4	78,0	78,7	82,3	82,0	80,8
	10	73,8	80,4	76,0	76,6	77,4	80,5	80,3	79,8

Tableau 3.2 : Températures (Td) et enthalpies (ΔH) de dénaturation d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL), à pH 7,0 en présence de dextran sulfate (DS), de κ -Carraghénane (κ -C) ou de xanthane (X).

Conditions	IPL (5%)	IPL (5%) + DS (5%)	IPL (5%) + κ-C (0,5%)	IPL (5%) + X (0,5%)
Td (°C \pm 0,5 °C)	74,8	78,0	76,1	77,0
ΔH (J/g \pm 1,5J/g)	3,20	6,90	5,10	2,76

Tableau 3.3 : Enthalpies de dénaturation d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL) en fonction du pH, de la concentration en protéines, de la concentration en dextran sulfate (DS) et de la présence de 0,5M NaCl.

Conditions		Enthalpies de dénaturation (J/g ± 1,5J/g)							
		IPL seul	IPL + NaCl	IPL + DS (1%)	IPL + DS (5%)	IPL + DS (10%)	IPL + DS (1%) + NaCl	IPL + DS (5%) + NaCl	IPL + DS (10%) + NaCl
pH	IPL (%)								
5,2	5	7,90	9,60	8,20	10,40	10,70	9,40	9,0	9,70
	10	9,30	10,95	9,50	11,85	12,70	10,55	10,80	10,40
7,0	5	3,60	7,80	2,80	6,90	4,60	6,40	5,20	7,50
	10	4,40	5,85	4,05	7,85	8,40	6,15	6,75	6,85

Tableau 3.4 : Températures (Td) et enthalpies (ΔH) de dénaturation d'un isolat de protéines de lactosérum prétraité (P-IPL) (5%) en présence de 0,5 M de NaCl et de dextran sulfate (DS).

Condition*	P-IPL	P-IPL + NaCl	P-IPL + DS (1%)	P-IPL + DS (2%)	P-IPL + DS (5%)	P-IPL + DS(7,5%)	P-IPL + DS (1%) + NaCl	P-IPL + DS (2%) + NaCl	P-IPL + DS (5%) + NaCl	P-IPL + DS (7,5%) + NaCl
Td (°C \pm 0,5°C)	76,3	83,8	78,8	78,7	79,1	78,9	82,6	83,2	83,2	82,7
ΔH (J/g \pm 1,5J/g)	2,39	5,56	2,91	3,64	4,66	4,59	4,35	3,09	3,63	4,10

* Le prétraitement a été réalisé sur une solution d'IPL (5%) à pH 7,0 dans un bain-marie à 70°C pendant 2 minutes.

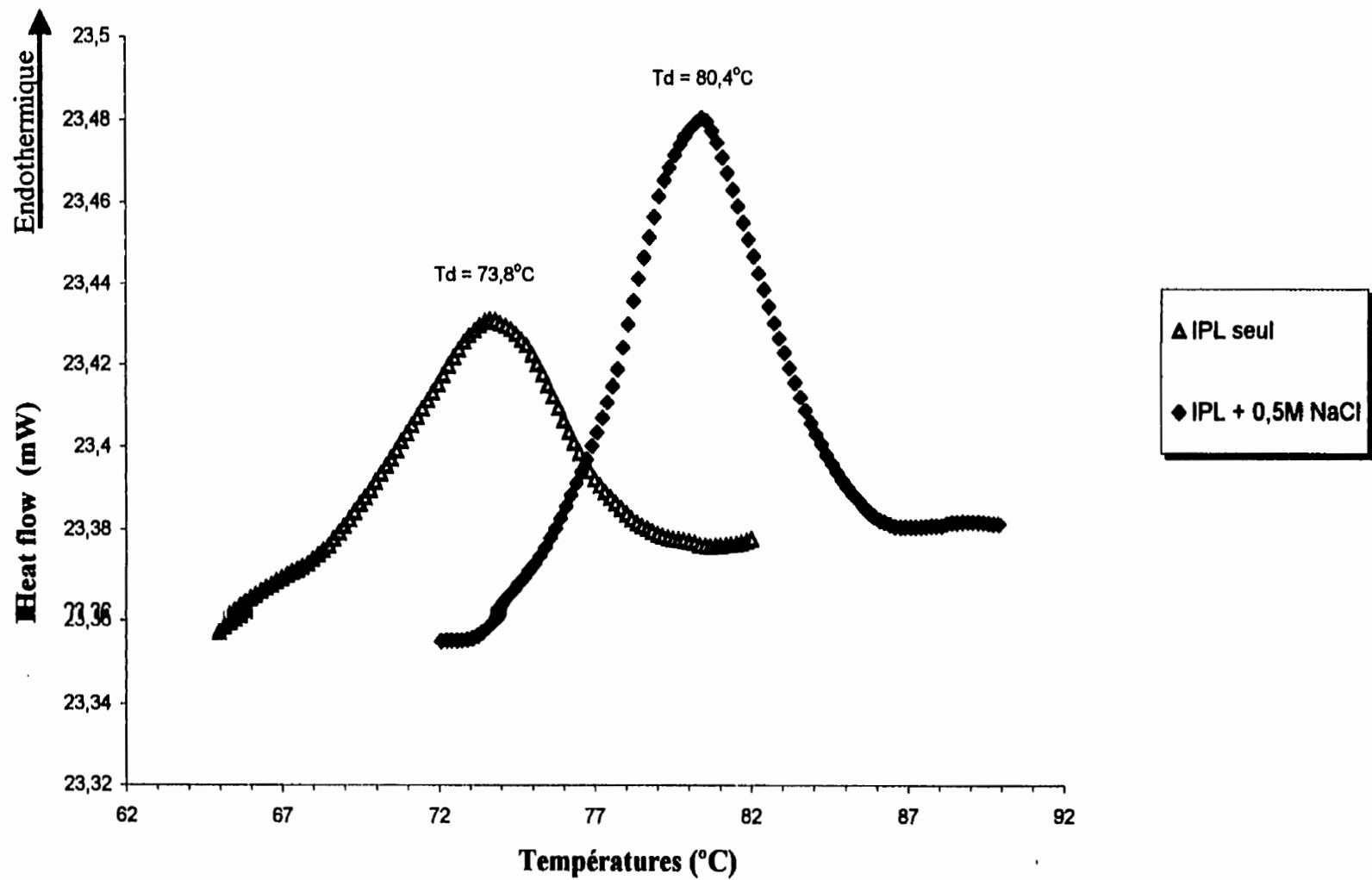


Figure 3.1 : Thermogrammes de solutions (10%) d'isolat de protéines de lactosérum natives (IPL) à pH 7,0 en présence et absence de 0,5M de NaCl (Td = température de dénaturation).

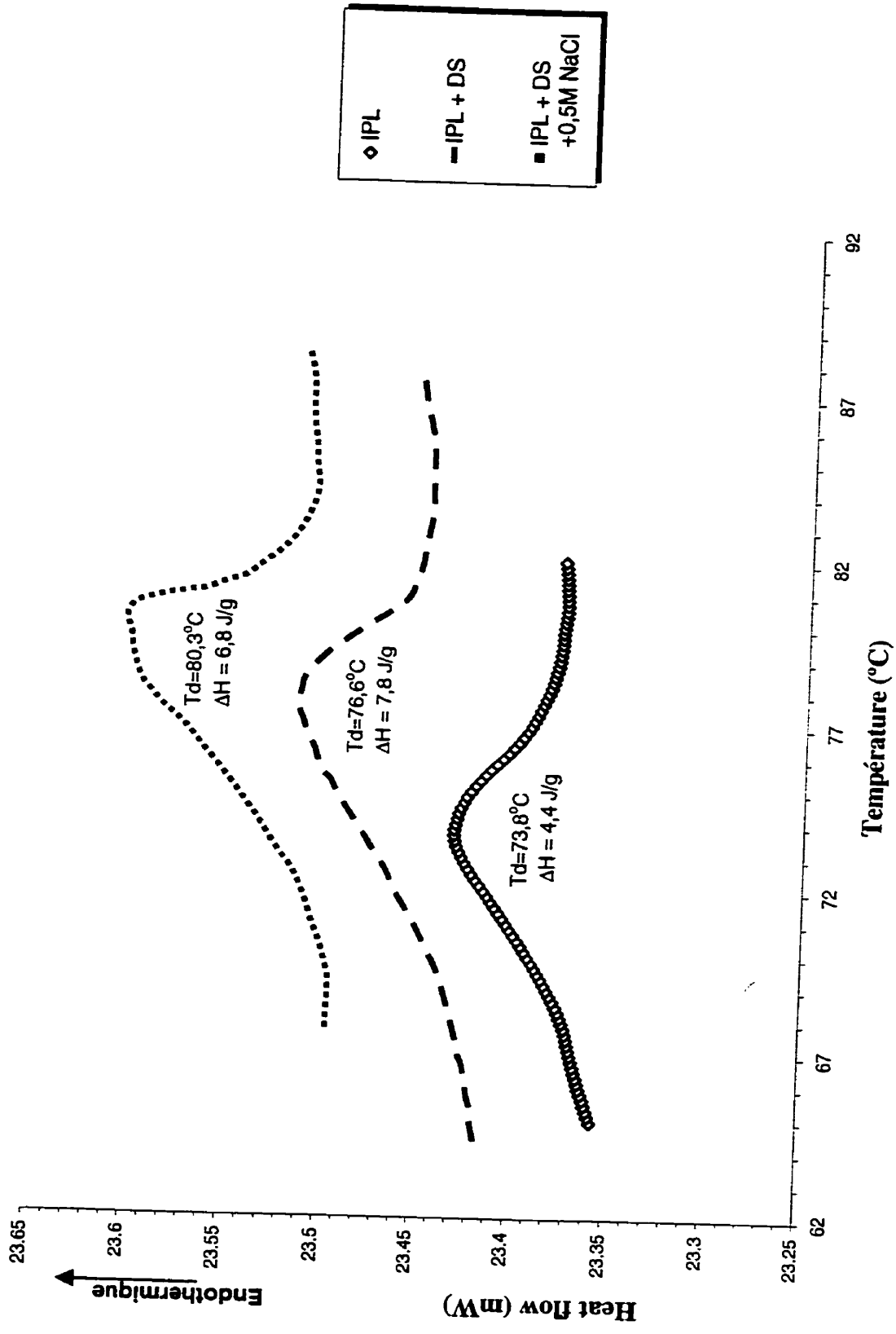


Figure 3.2 : Thermogrammes de solutions (10%) d'isolat de protéines de lactosérum natives (IPL) à pH 7,0, en présence de 5% de dextran sulfate (DS) et 0,5M de NaCl.

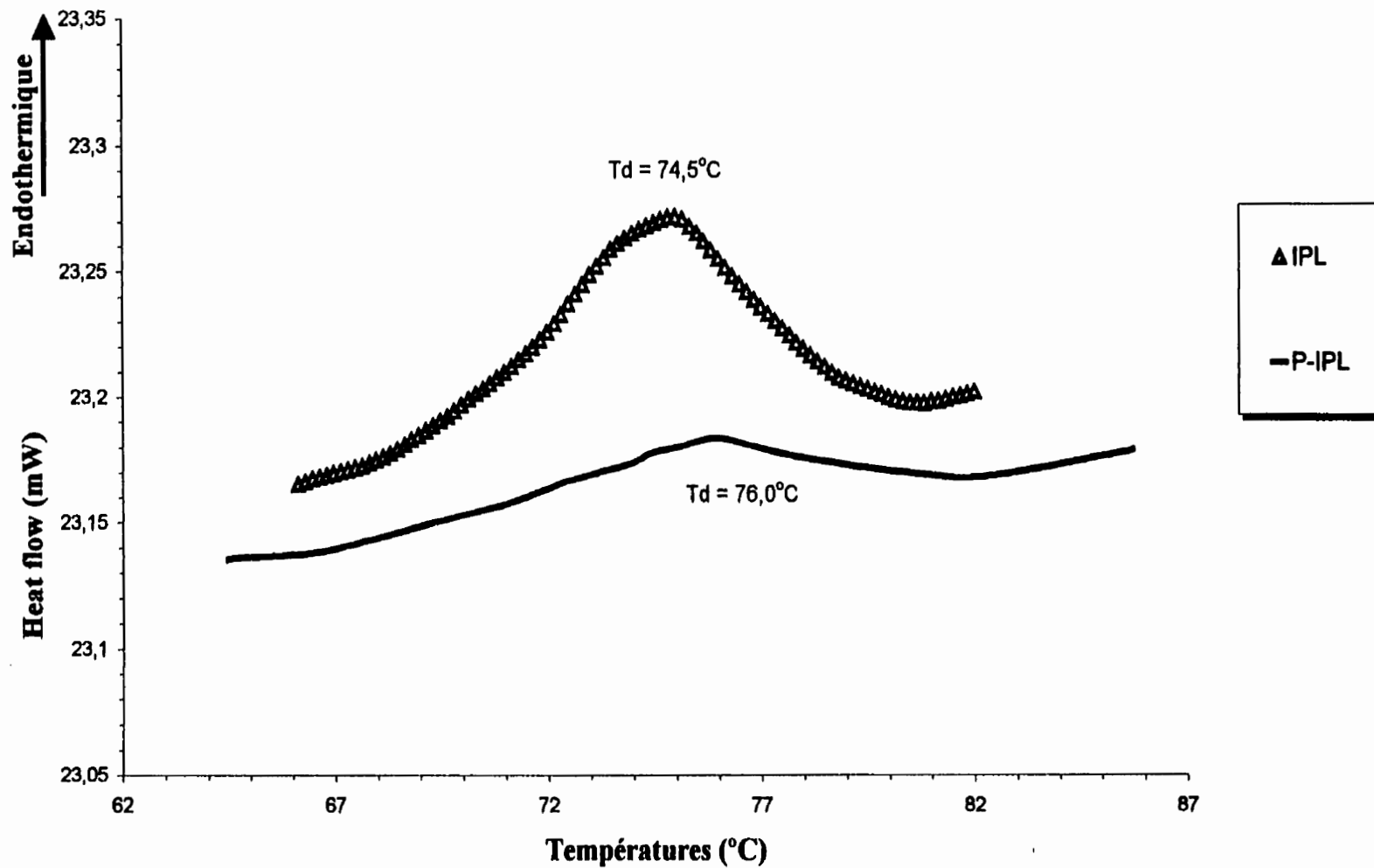


Figure 3.3 : Thermogrammes de solutions (8%) d'isolat de protéines de lactosérum natives (IPL) et prétraitées (P-IPL) à pH 7,0 (Td = température de dénaturation).

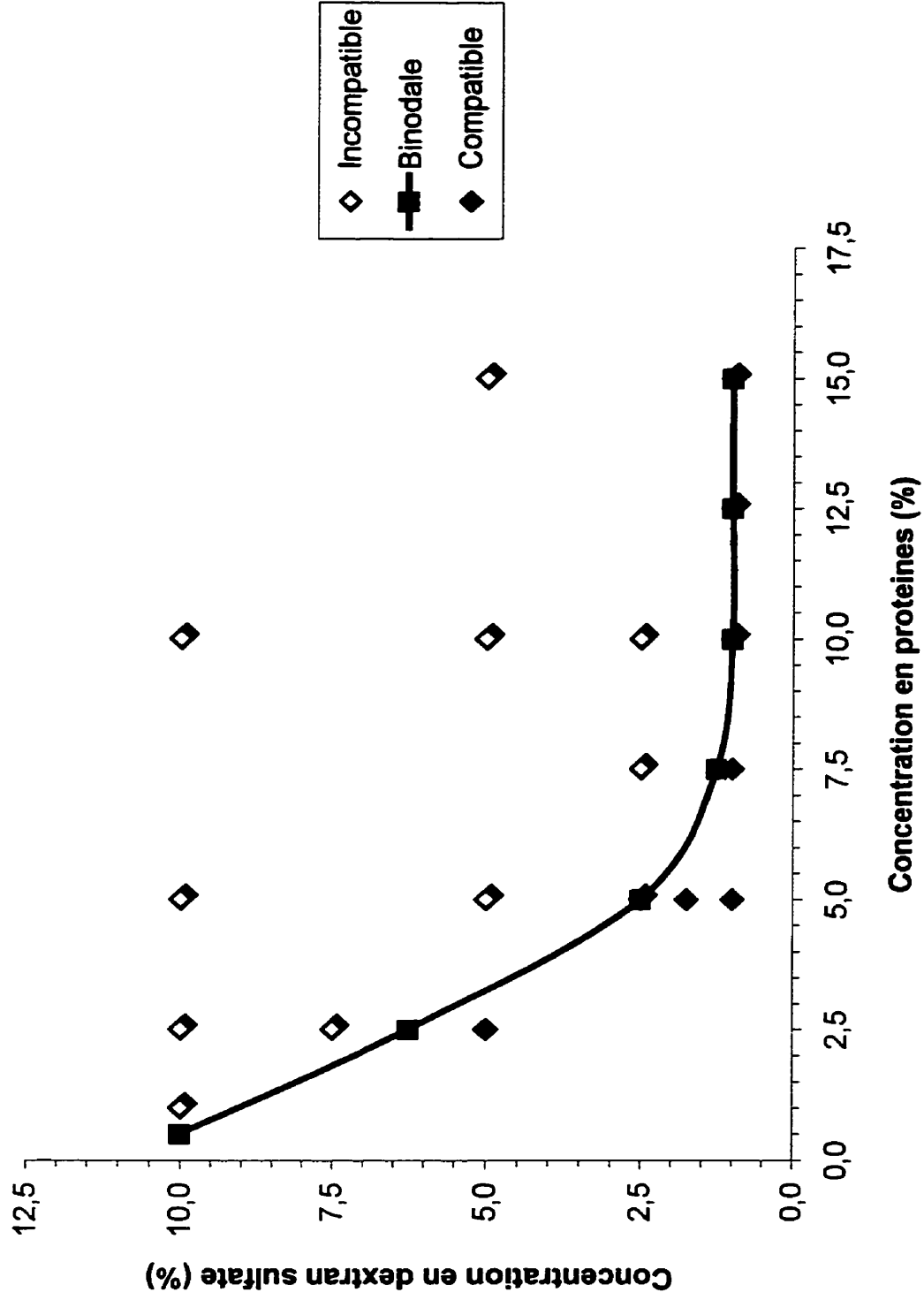


Figure 3.4 : Diagramme de phases du système IPL natif-dextran sulfate à pH 7 et en présence de 0,5 M de NaCl.

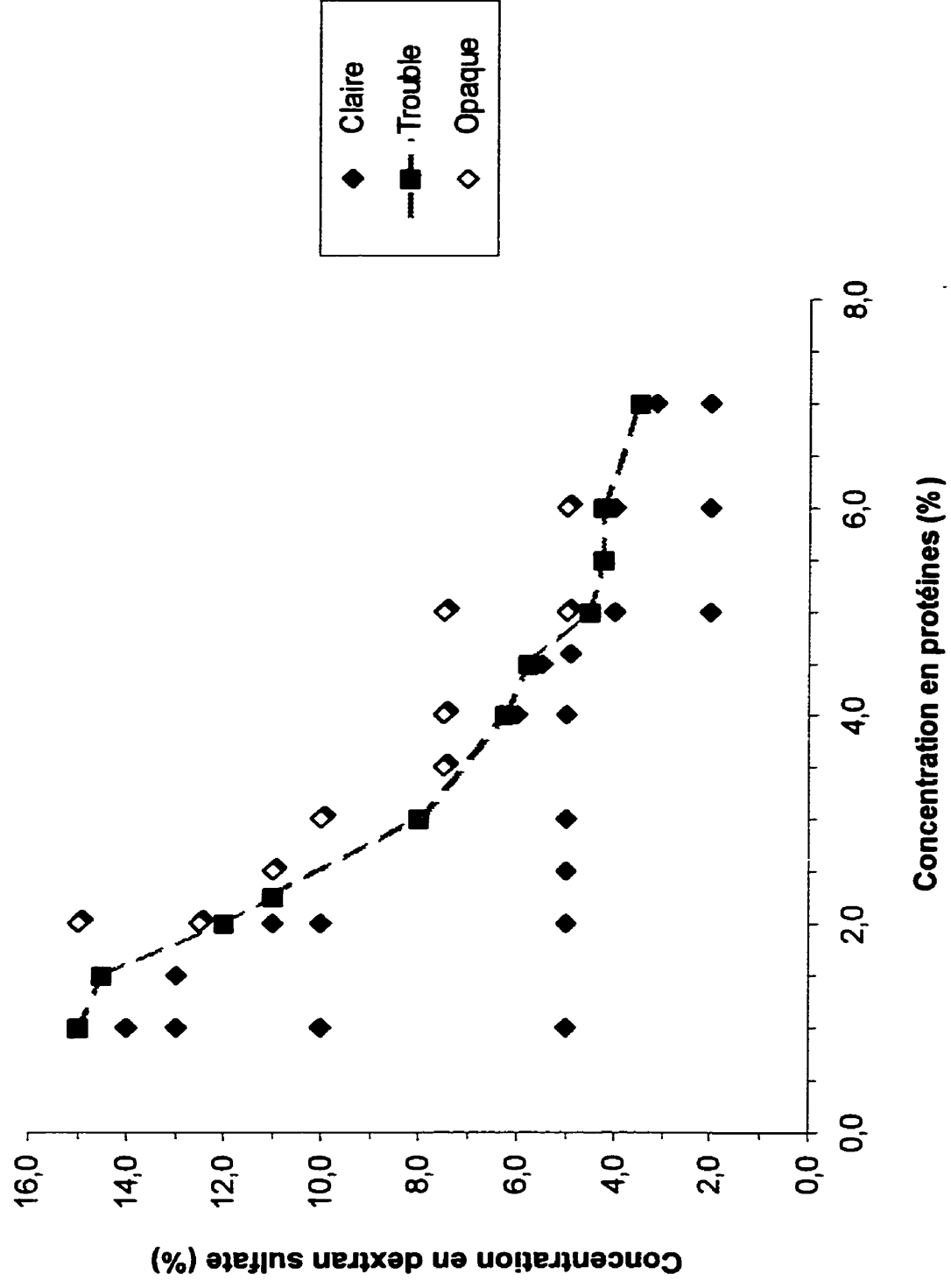


Figure 3.5 : Diagramme de phases du système IPL prétraité-dextran sulfate à pH 7.

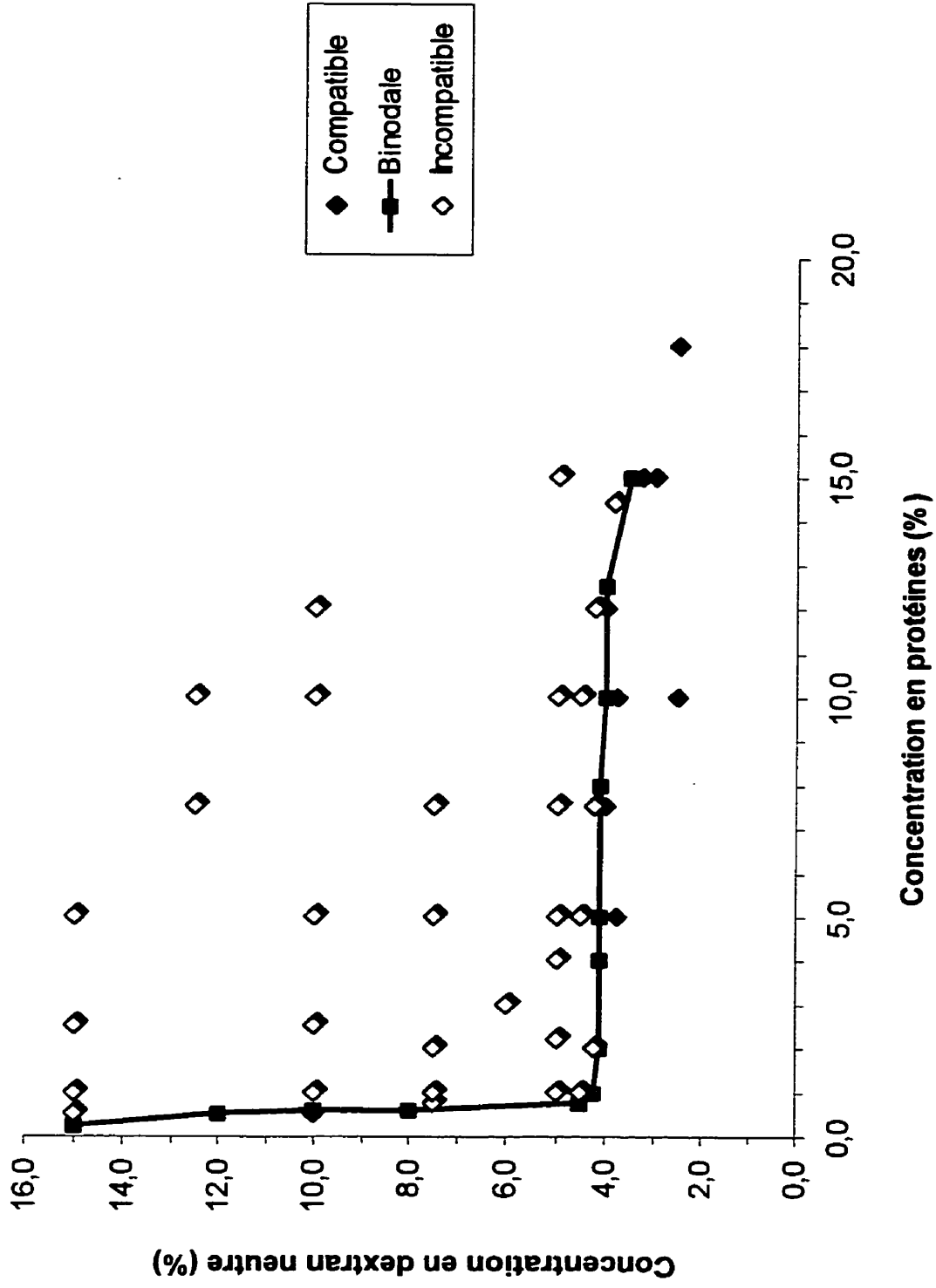


Figure 3.6 : Diagramme de phases du système IPL natif-dextran neutre à pH 5,2.

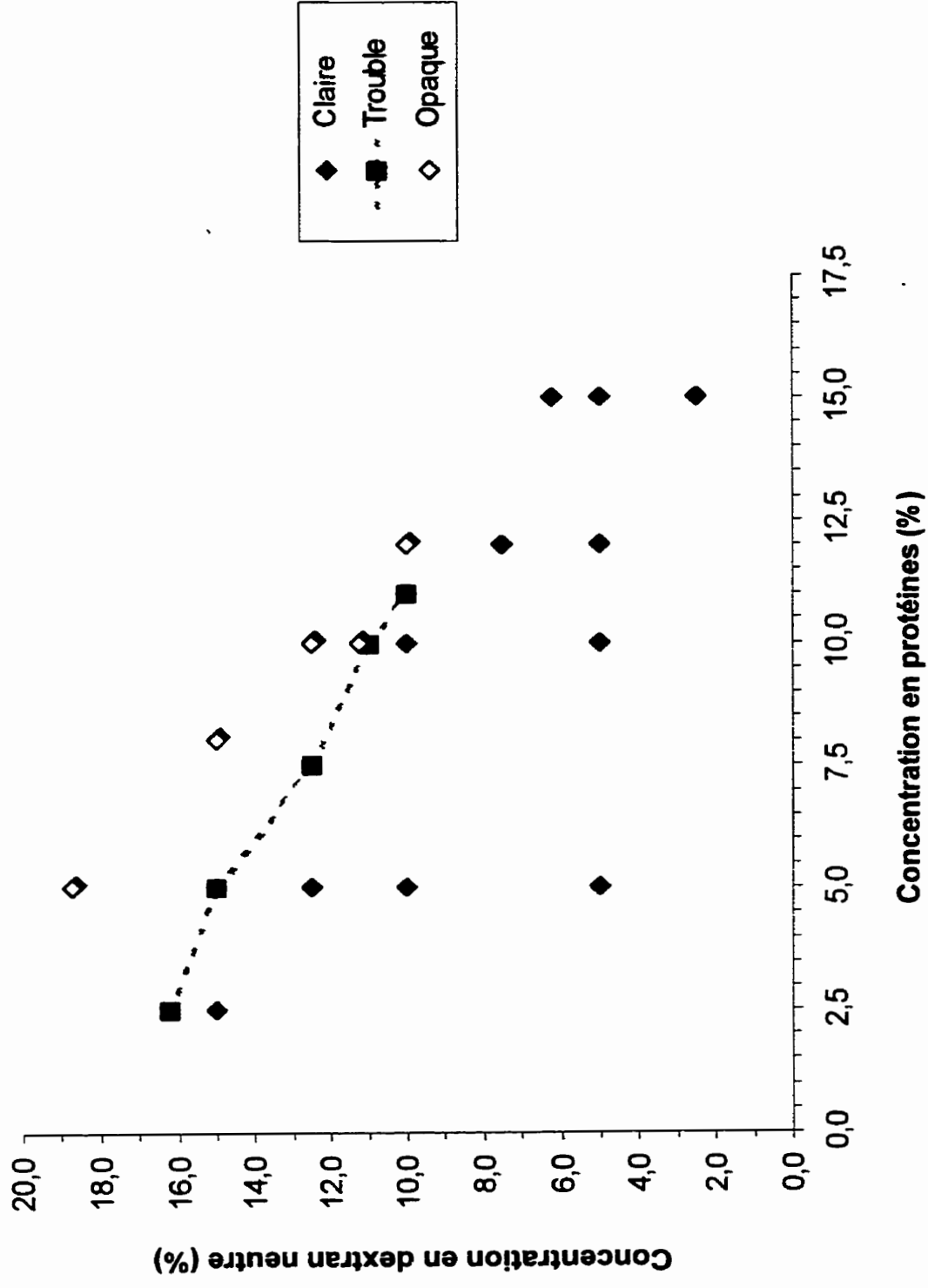


Figure 3.7 : Diagramme de phases du système IPL natif-dextran neutre à pH 7,0.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le comportement des protéines du lactosérum en solution est difficile à prédire puisqu'il varie significativement selon les autres substances présentes dans son environnement. Néanmoins, ces protéines font partie de la formulation d'un grand nombre de produits puisqu'elles possèdent de nombreuses propriétés fonctionnelles et nutritionnelles. L'étude des systèmes protéines-polysaccharides et de la stabilité thermique des protéines qui les constituent est indispensable à la compréhension et la prédiction du comportement des aliments et de l'effet de certaines transformations qu'ils subissent.

Cette étude nous a permis de vérifier que le comportement en solution de systèmes IPL-dextrans varie selon la charge que portent chacun des polymères et la conformation des protéines. De plus, elle nous a permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle la présence de divers polysaccharides et le type de système formé en solution (compatible ou incompatible) peut modifier le comportement des protéines de lactosérum à la dénaturation. Il a été démontré que l'ajout de polysaccharides anioniques comme le dextran sulfate peut avoir un effet protecteur sur la stabilité thermique d'un IPL. De plus, certains facteurs comme le pH, la présence de NaCl et l'ajout de différentes concentrations de polysaccharides peuvent aussi faire varier la température de dénaturation de l'IPL de plusieurs degrés Celsius.

La caractérisation des systèmes IPL-dextran neutre et IPL-dextran sulfate en solution aqueuse, à l'aide de diagrammes de phases, a révélée que la charge des polysaccharides et la force ionique du système influençaient grandement leur comportement et leur compatibilité. De plus, il a été observé que les zones d'incompatibilité des diagrammes de phases correspondaient généralement à des températures de dénaturation moins élevées en calorimétrie. Il semble que lors d'incompatibilité, les interactions entre polymères de même nature sont favorisées, réduisant l'effet protecteur du polysaccharide sur l'IPL. La compréhension du comportement des systèmes protéines-polysaccharides pourrait donc permettre de prédire la stabilité thermique de protéines en solution.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude à l'aide de protéines et de polysaccharides de différentes natures, afin de vérifier si l'effet du type de système formé en solution permet de prédire la stabilité thermique de la plupart des systèmes protéines-polysaccharide connus.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Albertsson, P.-A. (1995). Aqueous polymer phase systems : properties and application in bioseparation. Dans: Biopolymer mixtures, Harding, S.E., Hill, S.E., Mitchell JR (ed.) Nottingham: Nottingham University Press, pages 37-64.
- Bakan, J.A. (1971). Microscopic capsules, U.S. Patent 3,567,650.
- Barbeau, J., Gauthier, S.F. et Pouliot, Y. (1996). Thermal stabilization of β -lactoglobulin by whey peptide fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3939-3945.
- Barlow, I.E., Hardham, J.F. et Zadow, J.G. (1984). Stability of reconstituted whey protein concentrates to ultra-heat treatment processing. *J. Food Sci.*, 49:32-39.
- Benger Labs., British Patent 1,046,612, (1966) (C.A. 66,5757 s).
- Bernal, V. et Jelen, P. (1985). Thermal stability of whey proteins- a calorimetric study. *J. Dairy Sci.*, 68: 2847-2852.
- Boye, J.I., Alli, I., Ramaswamy, H. et Raghavan, V.G.S. (1997). Interactive Effects of Factors Affecting Gelation of Whey Proteins. *J. Food Sci.*, 62 (1): 57-65.
- Boye, J.I., Ismail, A.A. et Alli, I. (1996). Effects of physicochemical factors on the secondary structure of β -lactoglobulin. *J.Dairy Res.*, 63: 97-109.
- Brady, J.W. (1989). The roles of Dynamics and Solvation in Protein Structure and Function. Dans: Food Proteins. Soucie, W.G. et Kinsella, J.E. (ed.), American Oil Chemists Society, 431 pages.
- Bull, H.B. et Breese, K. (1978). Interaction of alcohols with proteins. *Biopolymers* 17:2121-2131.
- Cayot, P. et Lorient, D. (1998). Structure et Technologie des protéines du lait. Arilait recherches, Lavoisier Technique et Documentation, 363 pages.
- Chan, E. L. (1983). Heat induced changes in the proteins of whey protein concentrate. *J. Food Sci.*, 48: 47-56.
- de Belder, A.N. (1993). Dextran. Dans: Industrial gums, third Edition, Whistler R.L. et BeMiller J.N. (ed.), Academic Press, Inc. Chapitre 14: 399-421.
- de Wit, J.N. (1989). Functional properties of whey proteins. Dans: Developments in dairy chemistry-4, P.F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science, London & New-York, pages 323-345.
- de Wit, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.*, 81 :597-608.

de Wit, J.N. et Klarenbeek, G. (1981). A differential scanning calorimetric study of the thermal behavior of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 160°C. *J. Dairy Res* 48 : 293-302.

Dextrans Products Limited. Spécifications techniques. Janvier 1999, Scarborough, Ontario, Canada

Dickinson, E. (1993). Protein-polysaccharide interaction in food colloids. Dans: *Food colloids and polymer : Stability & mechanical properties*. Dickinson, E. et Walstra, P.(ed.), Royal Chem Soc., Cambridge, U.K., pages 77-93.

Dickinson, E. (1995). Emulsion stabilization by polysaccharides and protein-polysaccharide complexes. Dans: *Food polysaccharides and their applications*. Alistair M. Stephen (ed.), Marcel Dekker Inc., New-York, USA, page 501-515.

Dickinson, E. et Galazka, V.B. (1991). Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobuline with polysaccharides. *Food Hydrocoll.*, 5(3) : 281-296.

Fox, P.F. (1989). The Milk Protein System. Dans: *Developments in dairy chemistry-4*, P.F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science, London & New-York, pages 1-54.

Galani, D. et Owusu, R.K. (1996). The effect of heat on whey proteins. *Food Sci.Technol Today* 10(3): 163-168.

Galazka, V.B., Summer, I.G. et Ledward D.A. (1996). Changes in protein-protein and protein-polysaccharides interactions induced by high pressure. *Food Chem.*, 57: 393-398.

Galazka, V.B., Smith, D., Ledward D.A et Dickinson E. (1999). Complex of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high-pressure treatment. *Food Chem.*, 64: 303-310.

Gekko, K. et Noguchi, H. (1978). Effects of ionic dextran derivatives on heat precipitation of protein. *J. Agric. Food Chem.*, 26 (6):1409-1414.

Glicksman, M. (1982). Dextran. Dans: *Food hydrocolloids*. Vol. 1, Glicksman M. (Ed.), CRC Press Inc., Florida, USA, pages 157-166.

Grinberg, V. Ya. et Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of protein and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocoll.*, 11 (2): 145-158.

Imeson, A. (1997). *Thickening and gelling agents for food*, second edition. Imeson, A., (ed.) Blackie Academic & Professional, Chapman et Hall, London, England, 320 pages.

Kella, N.K. et Kinsella, J.E. (1988). Enhanced thermodynamic stability of β -lactoglobulin at low pH. *Biochem. J.* 255: 113-118.

- Kinsella, J.E. (1984). Milk proteins : physicochemical and functional properties. CRC, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 21 (3): 197-262.
- Kinsella, J. E., Whitehead, D.M., Brady, J.W. et Bringe N.A. (1989). Milk Protein Structure and Function. Dans: Developments in dairy chemistry-4, Fox, P.F. (ed.), Elsevier Applied Science, London & New-York, pages 55-96.
- Kristensen, A., Nylander, T., Paulsson, M. et Carlsson, A. (1997). Calorimetric studies of interactions between β -lactoglobulin and phospholipids in solutions. Int. Dairy J., 7: 87-92.
- Ledward, D.A. (1994). Protein-polysaccharide interactions. Dans: Protein functionality in food systems. Hettiarachchy N.S. et Zieger, G.R. (ed.), Marcel Dekker, New-York, pages 225-259.
- Lui, T.X., Relkin, P. et Launay, B. (1994). Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of β -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. Thermochem. Acta, 246: 387-403.
- Ma, C.-Y., Harwalkar, V.R. et Maurice, T.J. (1990). Instrumentation and Techniques of Thermal Analysis in Food Research. Dans : Thermal analysis of foods, Harwalkar et Ma (ed.), Elsevier Applied Science, London et New York, 360 pages.
- McCurdy, R.D., Goff, H.D., Stanley, D.W. et Stone, A.P. (1994). Rheological properties of dextran elated to food applications. Food Hydrocoll., 8 (6): 609-623.
- McKenzie, H.A. (1970) β -lactoglobuline. Dans: Milk-proteins :Chemistry and Molecular Biology. McKenzie H.A., (ed.) Academic Press, New-York. Vol. 2 pages 257-329.
- Molder, N.W. et Jones, J.P. (1987). Selected processes to improve functionality of dairy ingredients. Food Technol., 41: 114-147.
- Morr, C.V. et Josephson, J.V. (1968). Effect of calcium N-ethyl maleimide and casein upon heat-induce whey protein aggregation. J. Dairy Sci., 51 :1349-1355.
- Morr, C.V. et Foegeding, E.A. (1990). Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates : a status report. Food Technol., 44: 100-112.
- Noguchi, H. (1956). Interaction of proteins with polymeric materials. Biochim. Biophys. Acta, 22 : 459-462.
- Park, K.H. et Lund, B.L. (1984). Calorimetric study of thermal denaturation of β -lactoglobulin. J. Dairy Sci., 67: 1699-1706.
- Privalov, P.L. (1982). Stability of proteins: Proteins which do not present a single cooperative system. Dans: Advances in Protein Chemistry Vol. 35, Anfinsen, C.B., Edsall, J. T. et Richards, F.M. (ed.), Academic Press, Inc. New-York & London, pages 1-104.

- Relkin, P. (1994). Differential scanning calorimetry : a useful tool for studying protein denaturation. *Thermochim. Acta* 246: 371-386.
- Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 36(6) :565-601.
- Relkin, P. et Launay, B. (1990). Concentration effects on the kinetics of β -lactoglobulin heat denaturation : a differential scanning calorimetry study. *Food Hydrocoll.*, 4: 19-32.
- Riedel, C.L.(1994). Whey raw material for new products I. *Dtsch. Milchwirtsch.* 45:174-179.
- Schulz, G.E. et Schirmer, R.H. (1979). *Principals of Protein Structure*. Schulz G.E. et Schirmer R.H. (ed.) Springer-Verlag, New York, pages 27-45.
- Smithers, W.G., Ballard, J.F., Copeland, A.D., De Silva, K.J. Dionysius, D.A., Francis, F.L., Goddard, C., Grieve, P.A. McIntosh, G.H., Mitchell, I.R. Pearce, J. et Regester, G.O. (1996). New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 79:1454-1459.
- Snoeren, T.H.M., Payens, T.A., Jevnik, J., et Both, P. (1975). Electrostatic interaction between κ -carrageenan and κ -casein. *Milchwiss.* 30: 393-396.
- Syrbe, A., P.B. Fernandes, F. Dannenberg, W. Bauer and H. Klostermeyer (1995). Whey Protein + Polysaccharide Mixtures : Polymer incompatibility and its application., Dans: *Food Macromolecules and Colloids*, Dickinson, E. et Lorient, D. (ed.), Special publication, No. 156, Royal Society of Chemistry, London, pages 328-339.
- Tolstoguzov, V.B. (1986). Functional properties of proteins-polysaccharide mixtures. Dans: *Functional properties of food macromolecules*, Mitchell J.R. & Ledward D.A. (ed.), Elsevier, London, pages 385- 414.
- Tolstoguzov, V.B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocoll.*, 4(6): 429-468.
- Tolstoguzov, V.B. (1995). Some physico-chemical aspect of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocoll.*, 9(4): 317-332.
- Tolstoguzov, V.B. (1997). Protein-Polysaccharide Interactions. Dans: *Food Proteins and their applications*, Damodaran, S. et Paraf, A. (ed.), Marcel Dekker, 681 pages.
- Van Cleve, J.W., Schaefer, W.C. et Rist, C.E. (1956). The structure of NRRL B-12 dextran: methylation studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 78 : 4435.
- Varunsatian, S., Watanabe, K., Hayakawa, S. et Nakamura, R. (1983). Effects of Ca^{++} , Mg^{++} and Na^+ on heat aggregation of whey protein concentrates. *J. Food Sci.*, 48 : 42-46,70.

Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jelleman, A., et Van Boekel, M.A.J.J. (1999). Protein Preparations. Dans: Dairy Technology: Principles of Milk, Properties and Processes. Marcel Dekker, Inc. (Ed.), New-York, pages 471.

Watanabe, K. et Klostermeyer, H. (1976). Heat induced changes in sulphhydryl and disulphide levels of β -lactoglobuline A and the formation of polymers. J. Dairy Res. 43: 411-418.

Whistler, R.L. (1973). Dextran. Dans: Carbohydrates in solution. Gould R.F. (ed) American Chemical society, Washington, pages 242-255.

Xiong, Y.L., Karl, A.D. et Liping, W. (1993). Thermal aggregation of β -lactoglobulin :effect of pH, ionic environment and thiol Reagent. J. Dairy Sci., 76: 70-77.

ANNEXE A

Analyses RP-HPLC

La quantification des principales protéines du lactosérum, dans le surnageant et le culot, a été réalisée par chromatographie de phase inverse (RP-HPLC) à l'aide d'une colonne C₄ Vydac 214TP54 (de 4,6 mm de diamètre par 250 mm de longueur) installée sur un HPLC Waters (modèle 600E, Milford, MA) muni d'un détecteur UV (modèle 486 Waters) et d'un système d'injection (modèle 7725i, Rheodyne, Cotati, CA; ayant une boucle d'injection de 20 µL), le tout contrôlé par le logiciel chromatographique Millennium version 2.1 (Waters).

Les phases mobiles étaient composées d'eau, d'acétonitrile (ACN) et d'un agent d'appariement d'ions, l'acide trifluoroacétique (TFA). La proportion de ces composés dans les phases mobiles était la suivante : Phase A : EAU :ACN :TFA (90 :10 :0.11%) ; Phase B : EAU :ACN :TFA (10 :90 :0.1%). L'élution s'est faite à un débit de 1 ml/min avec le gradient des phases A / B suivant : 0-14 minutes 85%A/15%B ; 15-32 minutes, 63%A/37%B ; 33-34 minutes puis 35-39 minutes 30%A/70%B et finalement 40-41 et 42-47 minutes 85%A/15%B. La détection s'est faite à 214 nm et à 39°C.

Pour la quantification des protéines des courbes étalons à concentration croissante de chacune des protéines standard suivant ont été réalisées : solution standard de β-lactoglobuline (A et B), d'α-lactalbumine, de sérum-albumine bovine (Sigma Chem. Co, St.-Louis, MO, E.U.) et de ribonucléase A (qui sert de standard interne) (Léonil *et al.*, 1995; Parris et Bagainski, 1991; Pearce, 1983). L'analyse de l'IPL entier, du surnageant et du culot a été réalisée en duplicata.

Les résultats ont démontré que les deux fractions sont composées d'une même proportion des différentes protéines du lactosérum (β-lactoglobuline, α-lactalbumine et sérum-albumine bovine) (Figure A et Tableau A). La quantité de protéines récupérées dans le surnageant des différentes solutions mères d'IPL a varié entre 20 et 22% (évaluée par dosage d'azote, selon la méthode Kjeldahl). La concentration protéique de toutes les solutions a été évaluée approximativement à 20% pour l'établissement des diagrammes de phases et la calorimétrie.

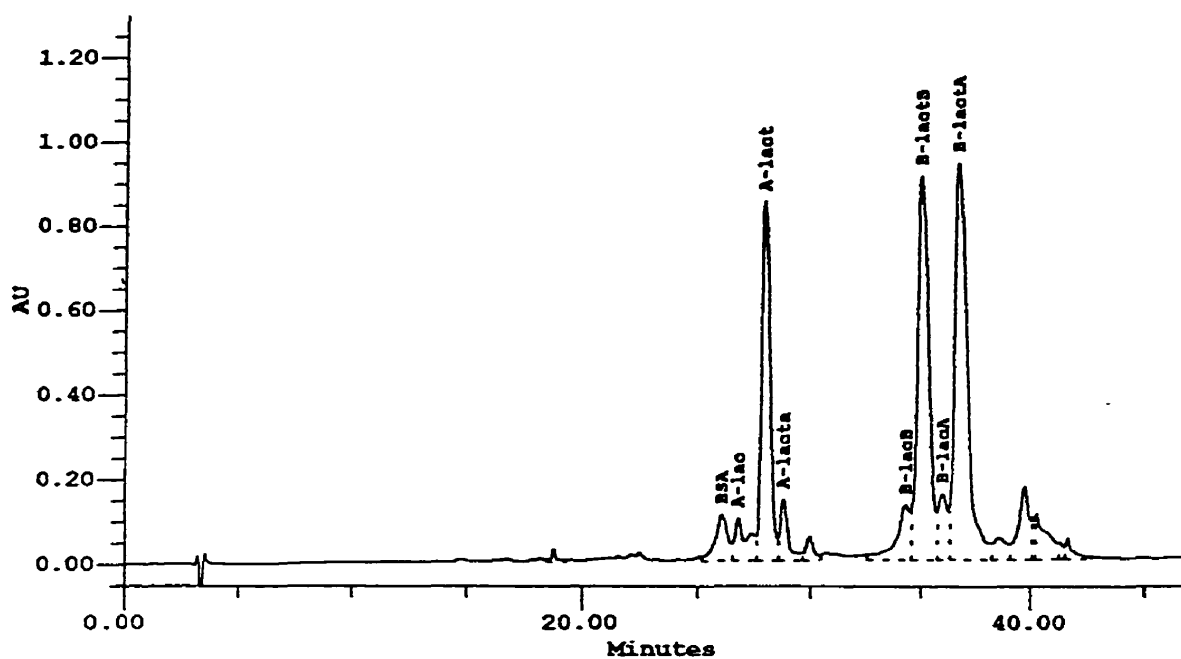


Figure A : Chromatogramme représentant la répartition en protéines d'une solution d'IPL avant centrifugation (IPL entier) obtenu par RP-HPLC.

Tableau A. Composition de l'IPL entier, du surnageant et du culot récupérés après centrifugation à pH 4,6 obtenue par RP-HPLC.

Principale protéine	IPL entier (%)	Surnageant (%)	Culot (%)
β -lactoglobuline	81,85	80,35	83,26
α -lactalbumine	18,08	18,36	18,24
Bovine sérum-albumine	0,90	1,20	-