

# CONCEPTION D'AGRÉGATS MIXTES FONCTIONNELS DE PROTÉINES DE LACTOSÉRUM ET DE MICELLES DE CASÉINES

**Auteur: Sanda MICLEUȘANU**

Université Technique de Moldavie

**Résumé:** *Pour émulsifier, c'est-à-dire rendre stable cinétiquement deux phases non miscibles, les industriels de l'agroalimentaire ou de la cosmétique utilisent plusieurs techniques. L'une des techniques les plus répandues consiste à émulsifier une phase dans l'autre en couplant une agitation mécanique à l'utilisation d'un composé émulsifiant stabilisant l'interface formée. Dans le lait, quand la matière grasse est émulsionnée, il se forme une interface qui est constituée de protéines laitières (micelle de caséine ; protéines de lactosérum). Toutefois, la plupart des micelles ont tendance à s'étaler progressivement à l'interface des globules gras, fragilisant l'interface. En identifiant des moyens qui limitent l'étalement des micelles de caséines à l'interface, celles-ci resteraient plus épaisses et les émulsions seraient plus stables.*

**Mots clés:** *émulsion, émulsions de « Pickering », interface, agrégats, micelles de caséines, protéines de lactosérum, microscopie à force atomique (AFM).*

## Introduction

Une émulsion est un mélange de deux phases liquides, non miscibles, dispersées l'une dans l'autre [1]. La production d'émulsion s'accompagne d'un accroissement considérable de l'aire interfaciale et nécessite un apport d'énergie au système. Quand l'énergie augmente, le système cherche naturellement à réduire la quantité d'interface afin de diminuer cette énergie libre stockée à l'interface. Ainsi, les gouttelettes nouvellement formées tendent à se rapprocher, puis à fusionner (coalescence) jusqu'à la séparation complète des deux phases. Les mécanismes principaux de déstabilisation des émulsions sont: le crémage, la floculation et la coalescence [2]. Pour répondre aux exigences du marché, les émulsions doivent résister à de nombreuses contraintes technologiques lors de leur fabrication, stockage ou usage. Afin de ralentir les phénomènes conduisant à la séparation de phase, les industriels laitiers ont toujours eu recours à l'utilisation d'additifs (lécithine, pectine, etc.). Aujourd'hui, les industriels tentent de supprimer ses additifs de leurs produits pour satisfaire la demande des consommateurs (démarche « clean label »), sans pour autant affecter la diversité et les caractéristiques des produits proposés.

Dans le secteur non-alimentaire, il a été montré que des émulsions particulièrement stables, désignées par le terme émulsions de « Pickering », stabilisent de façon définitive l'interface huile/phase aqueuse. Dans le cas de ces émulsions, la stabilité est assurée par la présence de particules solides fortement ancrées à l'interface. L'énergie pour décrocher une particule d'une interface est proportionnelle à la surface de contact entre la particule et la phase dispersée. Ainsi plus les particules sont grosses et en contact de la phase dispersée, plus il faudra d'énergie pour les déplacer de l'interface. Plus les particules sont hydrophobes plus leur surface de contact avec une phase hydrophobe (huile) sera importante et moins leur solubilité en phase aqueuse sera importante (auto-agrégation des particules). Les particules sont donc adsorbées de manière irréversible interdisant la réduction de l'aire interfaciale; il n'y a pas de coalescence (réduction de l'aire interfaciale) dans les émulsions de Pickering et celles-ci présentent une très grande stabilité [3].

Des études récentes suggèrent que des agrégats de protéines laitières (micelle de caséine réticulées par des protéines de lactosérum) pourraient jouer un rôle similaire aux particules solides pour la stabilisation des émulsions alimentaires [4]. Naturellement, il existe dans le lait des agrégats de taille  $> 100$  nm, les micelles de caséines. Ces micelles résultent de l'association de différentes caséines ( $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$ ,  $\kappa$ ), et de composants salins, formant des ponts calciques entre caséines [5]. Cependant, il n'est pas exclu que les micelles de caséines s'étalent à l'interface huile/phase aqueuse au moment de l'adsorption et perdent les propriétés de stabilisation.

De nombreuses études ont montré que les mélanges de protéines du lactosérum et de micelles de caséines, particulièrement la  $\beta$ -lactoglobuline et la caséine  $\kappa$  peuvent former des liaisons durant un traitement thermique. La formation d'agrégats purs de protéines du lactosérum est peu probable et la majorité des protéines du lactosérum dénaturées interagissent avec la caséine  $\kappa$  pour former des agrégats mixtes. En revanche malgré de nombreux travaux on ne sait toujours pas comment, ni sous quelle forme (monomère, polymère) les caséines  $\kappa$  interviennent dans l'agrégation. Par contre il est clairement établi que la caséine  $\kappa$  a un rôle important dans le contrôle de la taille et de la forme des agrégats [6]. Par ailleurs il est indiqué que

suivant les conditions de pH auquel est réalisé le traitement thermique, les agrégats mixtes sont localisés soit à la surface des micelles de caséines soit solubilisés dans la phase solvante [7].

Un des principaux objectifs était donc d'obtenir des agrégats mixtes fonctionnels de protéines de lactosérum et de micelles de caséines afin de voir si ces agrégats protéiques constituent des candidats potentiels pour la formation d'émulsions de « Pickering ». En sachant que dans diverses conditions du milieu on peut obtenir différentes structures protéiques, nous avons fait varier le pH et le rapport des micelles de caséines et des protéines de lactosérum traités ou non traités thermiquement.

Grâce à la microscopie à force atomique (AFM) nous avons pu déterminer et comparer les hauteurs, les diamètres et l'angle de contact des micelles de caséines. Nous avons observé également l'aspect des micelles adsorbées à une surface solide (modèle pour l'interface des globules gras), en captant des étonnantes images à l'échelle du nanomètre. La microscopie à force atomique est donc une technique qui permet d'analyser la topographie de surface d'un échantillon. Une pointe microscopique couplée à un micro-levier est mis en mouvement de balayage à la surface de l'échantillon. L'inflexion du micro-levier qui se produit en fonction de la variation des forces d'interaction pointe-surface est suivie par le biais de la réflexion d'un faisceau laser projeté sur le micro-levier puis récupéré sur un miroir quadripolaire. La position du laser sur ce miroir est traduite en termes de déviation verticale de la pointe AFM sur l'échantillon avec une résolution nanométrique. Cela permet de reproduire une image tridimensionnelle de la surface de l'échantillon [8].

## 1. Méthodes expérimentales

Pour l'ensemble des travaux, on a utilisé le lait natif, écrémé (~3,3 % protéines) et la poudre des isolats de protéines de lactosérum (WPI) (72%) qu'on a dispersées (40g/L) dans une solution aqueuse de perméat (PUF) (5,6%). Pour une partie des expériences on a utilisé le lait frais écrémé sans modification de la composition en protéine: le rapport micelles de caséines/protéines de lactosérum est 80/20. Pour une seconde série d'expérience, le rapport micelles de caséines/protéines de lactosérum a été modifié par ajout d'une solution de WPI commercial reconstitué à 4% dans du PUF à 5.6% pour atteindre un rapport micelle de caséine/protéines de lactosérum 40/60, puis dilué trois fois avec du PUF, pour obtenir une concentration proche de celle des laits infantiles (substitut de lait maternel) (protéines 1,1 %). Le pH des solutions a été ajusté à pH 6.8 ou 6.3 en utilisant HCl 1 M ou NaOH 1 M. Ensuite, les solutions ont été réparties dans une série de tubes de 1 mL. Un tube de chaque série a été placé à 4°C alors que les autres ont été placés dans un bain-marie réglé à 80° C. Puis, après 20 minutes, les tubes ont été enlevés et mis tout de suite dans la glace pour stopper la réaction de dénaturation/agrégation des protéines de lactosérum.

Pour l'analyse par microscopie à force atomique (AFM), les protéines sont immobilisées sur des plaques recouvertes d'or. Des carrés (1 x 1 cm<sup>2</sup>) de verre pulvérisés d'or colloïdal (produit commercial Platypus AU.0500.ALSI), découpées au diamant, ont été collés sur des lames de verre à puits (24h de séchage de la colle en dessiccateur). Après collage, les lames sont immergées dans une solution de 11-MUA (mercaptoundecanoic acid) dissous en éthanol absolu, pendant au moins 24h. Brièvement, les lames d'or greffées de COOH sont rincées à l'éthanol puis à l'eau milli-Q (ultra-pure), puis exposées pendant 15-20 min à un mélange contenant 0,4M EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) et de 0,1M NHS (N-hydroxysuccinimide) solubilisés dans de l'eau milli-Q. Après la chimie EDC/NHS, les lames sont rincées de nouveau à l'eau milli-Q et exposées aux solutions de protéines pendant ~ 30 minutes. Afin d'éliminer les micelles non immobilisées, les lames sont rincées avec les perméats de même pH que les solutions (par pipetage in-out): avec de PUF (5-6 fois) et avec du SMUF (2-3 fois). Mises dans des boîtes de Petri, les lames sont déshydratées pendant quelques heures dans un dessiccateur à silice sous vide. Une fois secs, les échantillons sont rincés avec une goutte d'eau milli-Q pour enlever les cristaux de sels provenant du SMUF et ré-séchés avant l'imagerie.

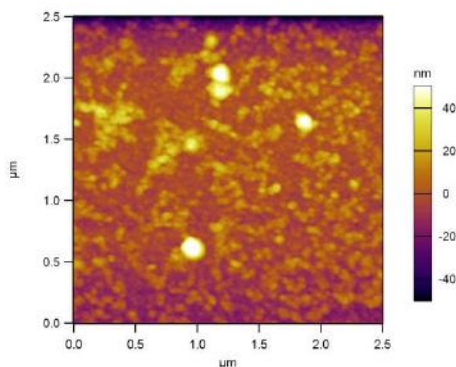
Les images sont obtenues avec le microscope à force atomique MFP-3D-BIO, (Asylum Research, Santa Barbara, USA) en mode contact intermittent ou « tapping » (mode AC), avec la sonde AC240TS. Chaque échantillon a été étudié en choisissant au minimum 5 emplacements différents, et en appliquant différents grossissements: dimensions des images variant de 10 x 10 µm à 1 x 1 µm. La résolution a été fixée à 256 x 256 pixel<sup>2</sup>. Les images sont analysées grâce au logiciel MFP3D. Le logiciel nous a permis de mesurer à la main (pour plus de précision), le diamètre et la hauteur au sommet des objets.

## 2. Résultats et Discussions

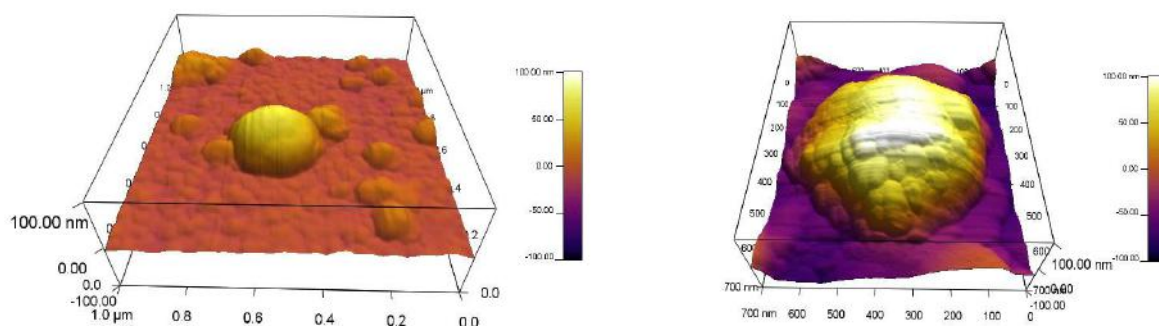
L'objectif de ce travail était d'obtenir des micelles de caséines réticulées par des protéines de lactosérum et de comprendre comment leurs caractéristiques influencent leurs propriétés d'adsorption à une surface modèle. Ainsi, par AFM (microscopie à force atomique) nous avons déterminé et comparé la hauteur et le diamètre des micelles de caséines non chauffées (non réticulées) et traitées thermiquement (réticulées) à

80 °C pendant 20 minutes. Pour cela, nous avons fixé sur des plaques d'or des micelles de caséine et de protéines de lactosérum au ratio 80/20 et 60/40, ajustés à pH 6.8 ou 6.3.

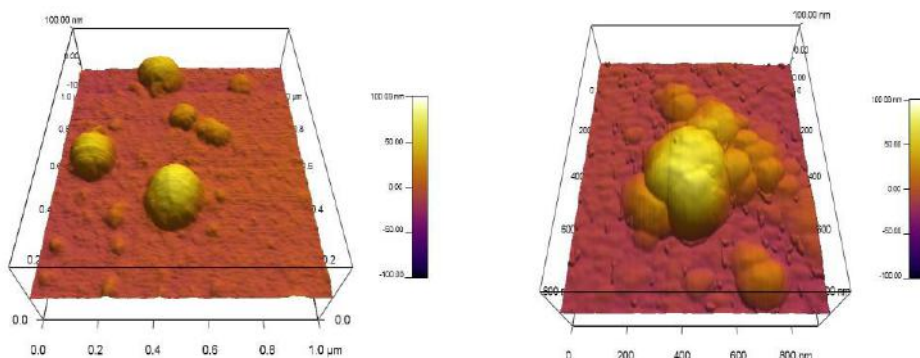
L'AFM a donc permis de calculer l'angle de contact et d'obtenir une information en 2 (Fig. 1) ou en 3 dimensions des micelles de caséines (Fig. 2 et Fig. 3). Sur les figures, la barre positionnée à droite de l'observation microscopique indique la hauteur des micelles. Des micelles individuelles avec un diamètre d'environ ~300 nm avec une rugosité nanométrique typique sont facilement distinguées sur les surfaces d'or analysées. Selon les images tridimensionnelles on observe que les micelles ont la forme d'une calotte sphérique suite à leur adsorption sur la surface. Du fait que les micelles de caséine présentent un caractère déformable, celles-ci s'étale au moment de l'adsorption sur la surface mais elles conservent le même volume. Ainsi l'AFM a tendance à surestimer légèrement le diamètre des micelles de caséines par rapport au diamètre déterminé en solution en raison de leur étalement lors du dépôt sur la surface d'observation.



**Fig. 1.** Image en 2D réalisée par l'AFM. L'immobilisation des micelles de caséines natives (ratio CM/PS 80/20) à pH 6,3.



**Fig. 2.** Images en 3D, réalisées par l'AFM. Micelles de caséines (ratio CM/PS 80/20) à pH 6,8 : micelle non chauffées (non réticulées); micelles traités thermiquement 20 min. à 80 °C.



**Fig. 3.** Images en 3D, réalisées par l'AFM. Micelles de caséines (ratio CM/PS 80/20) à pH 6,3 : c. micelle non chauffées (non réticulées) ; d. micelles traités thermiquement 20 min. à 80 °C.

Selon les résultats obtenus, pour les 2 rapports CM/PS étudiés à pH 6,8 les micelles réticulées sont plus cohésives et ont un angle de contact plus important. Au contraire, à pH 6,3 on observe une augmentation de la proportion des protéines de lactosérum associées à la micelle mais celles-ci empêchent peut-être l'étalement des micelles sur la surface d'or. Ceci est peut-être dû à la solubilisation d'une partie du phosphate de calcium qui participe à la cohésion de la structure micellaire. Finalement, les micelles de caséines présentant une réticulation plus faible avec des agrégats de protéines de lactosérum (pH 6,8) sont malgré tout plus rigides, ayant une hauteur et un angle de contact plus important. Elles constituent des objets intéressants pour l'étude de leur aptitude à stabiliser les émulsions selon un mécanisme décrit par Pickering.

En conclusion, les micelles de caséine sont des particules très sensibles à des variations des conditions du milieu mais aussi à l'adsorption sur une surface telle que celle utilisée dans cette étude. Suite à ce travail on a mieux compris les propriétés mécaniques des micelles de caséine modifiées à s'adsorber sur une surface modèle, mais pour être plus exact et pour pouvoir répondre à de nombreuses questions il reste encore à développer ces études. Il sera donc intéressant de mieux étudier la composition de la phase soluble après le traitement thermique pour pouvoir apporter plus des informations sur la structure de l'assemblage formé. La maîtrise de la physico-chimie de ces assemblages constitue ainsi un fort enjeu pour pouvoir maîtriser les propriétés et la qualité finale des produits destinés au consommateur.

### **Bibliographie**

1. BECHER (P.). – *Emulsions: theory and practice 2e éd.* Reinhold Publishing Corp., New York (1965).
2. JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCH P. et BRULÉ G., 2006, *Science des aliments : Biochimie-Microbiologie-Procédés-Produits, Vol 1 : Stabilisation biologique et physico-chimique*, Tech & Doc, Paris, 383 pp.
3. Claire C. Berton-Carabin & Schroën K. (2015). *Pickering Emulsions for Food Applications : Background, Trends, and Challenges. The Annual Review of Food and Technology*, 6:12.1-12.35
4. Wu J., Shi M., Li W., Zhao L., Wang Z., Yan X., Norde W., Li Y. (2015). *Pickering emulsions stabilized by whey protein nanoparticles prepared by thermal cross-linking. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 127, 96-104.
5. JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCH P. et BRULÉ G., 2007, *Science des aliments : Biochimie - Microbiologie - Procédés - Produits, Vol 2 : Technologie des produits alimentaires*, Tech & Doc, Paris, 456 pp.
6. Donato L., Guyomarc'h F. (2009). *Formation and properties of the whey protein/kappa-casein complexes in heated skim milk – A review. Dairy Science and Technology*, 89, 3-29. DOI : 10.1051/dst:2008033
7. Anema, S. G., Lowe E. K., Kim Lee S. (2004). *Effect of pH at heating on the acid-induced aggregation of casein micelles in reconstituted skim milk. Swiss Society of Food Science and Technology*, 37, 779-787.
8. Anema, S. G. (2007). *Role of  $\kappa$ -Casein in the Association of Denatured Whey Proteins with Casein Micelles in Heated Reconstituted Skim Milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3635-3642.
8. Francius G., 2011, AFM Express. *Guide pratique pour la Microscopie à Force Atomique - exploration du « nanoMonde » Les Cahiers de l'Ecole Doctorale Lorraine de Chimie et Physique Moléculaires*, Presses universitaires de Nancy, 38 p.