



HAL
open science

Compréhension des mécanismes de formations des agrégats protéiques en solution sous l'effet du cisaillement

Valentin de Ruyter, Jeehyun Lee

► **To cite this version:**

Valentin de Ruyter, Jeehyun Lee. Compréhension des mécanismes de formations des agrégats protéiques en solution sous l'effet du cisaillement. Ingénierie des aliments. 2024. hal-04551322

HAL Id: hal-04551322

<https://hal.inrae.fr/hal-04551322>

Submitted on 18 Apr 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



UMR 1253 STLO

INRAE

Institut Agro Rennes-Angers

65 rue de Saint Briec

35000, Rennes

Université de Lille

I.U.T A de Lille

Département Chimie

Le recueil, rue de la recherche

59653, Villeneuve d'Ascq

Compréhension des mécanismes de formations des agrégats protéiques en solution sous l'effet du cisaillement

Stage réalisé du 22/01/2024 au 26/04/2024

Pour validation du B.U.T 3^{ème} année option Matériaux et Produits Formulés

Présenté et soutenu par Valentin DE RUYTER

Maître de stage : Mme. Jeehyun LEE, Maître de Conférences

Tuteur enseignant : M. Ahmed IDOUSSAADEN, Professeur des Universités

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à mon apprentissage et qui m'ont apporté leur soutien.

Je remercie tout particulièrement Jeehyun LEE et Margot GROSTETE de m'avoir si merveilleusement encadré et de m'avoir aidé dans la rédaction de ce rapport de stage.

Je remercie également tout le personnel du STLO qui m'a chaleureusement accueilli. Ils ont pris de leur temps pour me former sur les différents appareils et ont été toujours disponibles pour répondre à mes questions.

Enfin, je remercie le corps enseignant du BUT Chimie pour les connaissances apportées durant mes études qui m'ont servi pendant ce stage et leur suivi pédagogique durant ce stage.

Résumé

L'objectif du stage a été de d'évaluer l'impact de la concentration et du cisaillement sur la dénaturation et l'agrégation des protéines sériques du lait en solution, afin de mieux comprendre l'encrassement des matrices laitières dans des évaporateurs à flot tombants pendant la concentration par évaporation. Des solutions d'isolat de protéines sériques à 5, 10 et 12 % p/p ont été préparées et cisailées aux taux de cisaillements différents (0, 50, 100 et 175 s⁻¹), à 65 °C pendant 10 min, en utilisant un rhéomètre et une géométrie cône/plan. Les analyses chromatographiques, colorimétriques et spectroscopiques des solutions traitées ont permis de conclure sur un effet prédominant de la concentration en protéines sur leurs dénaturation et agrégation car le taux de dénaturation et l'agrégation indirectement observée ont augmenté avec l'augmentation de la concentration en protéines. Néanmoins, l'impact du cisaillement sur ces phénomènes a été peu significatif. En perspective, en comparant ces résultats à ceux qui ont été obtenus à l'interface solution/surface, il serait possible de mieux comprendre les mécanismes de formation des dépôts protéiques sous l'action du cisaillement.

Abstract

The goal of this internship was to evaluate the impact of concentration and shear on the denaturation and aggregation of milk serum proteins in solution, to better understand the fouling of dairy products in falling film evaporators during concentration by evaporation. Serum protein isolate solutions at 5, 10 and 12% w/w were prepared and sheared at different shear rates (0, 50, 100 and 175 s⁻¹), at 65 °C for 10 min, using a rheometer and cone/plane geometry. The chromatographic, colorimetric and spectroscopic analysis of the treated solutions made it possible allowed us to conclude on a predominant effect of the protein concentration on their denaturation and aggregation because the denaturation level and the aggregation indirectly observed increased with the increase in the protein concentration. However, the impact of shear on these phenomena was less significant. In perspective, by comparing these results to those which were obtained at the solution/surface interface, it would be possible to better understand the mechanisms of formation of protein deposits under the action of shear.

Table des matières

1. Introduction	6
2. Organisme d'accueil.....	7
2.1. INRAE.....	7
2.2. UMR STLO.....	8
3. Matériels et méthodes.....	10
3.1. Préparation de la solution de protéines de lactosérum.....	10
3.2. Traitement de cisaillement des solutions de protéines de lactosérum.....	11
3.3. Taux de dénaturation par HPLC-DAD.....	12
3.4. Indice de brunissement par mesure colorimétrique.....	14
3.5. Turbidité par mesure spectroscopique.....	15
3.6. Prise d'images par observation microscopique.....	15
4. Discussions et résultats.....	16
4.1. La viscosité.....	16
4.2. Le taux de dénaturation.....	17
4.3. L'indice de brunissement.....	19
4.4. La turbidité.....	20
4.5. Les images.....	20
5. Conclusion.....	21
Références.....	22

Liste des illustrations

Figure 1 : Quelques chiffres sur INRAE

Figure 2 : Organigramme de l'UMR STLO

Figure 3 : Schéma d'une géométrie cône-plan

Figure 4 : Illustration de la méthode d'injection avec gradient de débit

Figure 5 : Viscosité des solutions de protéines de lactosérum à différentes concentrations (5 % bleu ; 10 % vert ; 12% rouge) cisillées à 65 °C, à différents taux de cisaillement (50, 100,175 s⁻¹) en fonction du temps (n = 3)

Figure 6 : Exemple de courbe d'étalonnage de l' α -lac et de la β -lg pour une solution de 10 % (p/p) en protéines de lactosérum

Figure 7 : Histogramme de la concentration en protéines natives d' α lac en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements

Figure 8 : Histogramme de la concentration en protéines natives de β lg en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements

Figure 9 : Histogramme du pourcentage de protéines dénaturées d' α lac en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements

Figure 10 : Histogramme du pourcentage de protéines dénaturées de β lg en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements

Figure 11 : Image d'une solution de protéines de lactosérum à 10 % (p/p) traitée au rhéomètre

Figure 12 : Image d'une solution de protéines de lactosérum à 10 % (p/p) non traitée au rhéomètre

Figure 13 : Histogramme de l'indice de brunissement en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements

Figure 14 : Histogramme de la turbidité en fonction de la concentration pour différents taux de cisaillement

Figure 15 : Image du microscope Keyence d'une solution de protéines de lactosérum à 10 % (p/p) traitée au rhéomètre avec un taux de cisaillement de 100 s^{-1}

Figure 16 : Image du microscope Olympus d'une solution de protéines de lactosérum à 10 % (p/p) avec ajout de thioflavine traitée au rhéomètre avec un taux de cisaillement de 100 s^{-1}

Liste des abréviations

α -lac : α -lactalbumine

β -lg : β -lactoglobuline

HPLC : High Performance Liquide Chromatography

WPI : Whey protein isolate (*en français : isolat de protéines de lactosérum*)

1. Introduction

L'encrassement au cours d'opérations unitaires comme le traitement thermique et la concentration par évaporation est récurrentement observé en industrie laitière. Il consiste en l'accumulation de constituants de la matrice laitière liquide traitée sur une surface en acier inoxydable sous l'action de gradients de température et de l'écoulement. Les dépôts d'encrassement formés diminuent les transferts de chaleurs de manière significative et peuvent former des biofilms. En conséquence, des étapes de nettoyage coûteuses (en temps, ressources et énergie) sont nécessaires afin que les surfaces reviennent à leur propreté initiale. Ainsi, comprendre afin de prévenir les phénomènes d'encrassement est un enjeu primordial.

Quelques études sont réalisées sur l'encrassement dans les échangeurs de chaleur pendant le traitement thermique. Les résultats de ces travaux ont montré que les dépôts solides dus aux matrices laitières consistent principalement en protéines (notamment protéines solubles) et minéraux (*e.g.* phosphates de calcium), dont le ratio est fortement influencé par les conditions environnementales, en particulier de la température. D'autres composants du lait, tels que les caséines, le lactose, les globules gras, sont très peu représentés dans les dépôts et, par conséquent, leur rôle dans le développement de l'encrassement thermique reste encore à déterminer. Néanmoins, l'opération de concentration par évaporation sous vide est très peu traitée dans la littérature. De plus, les connaissances sur le traitement thermique sont difficilement extrapolables car la température de travail peut être plus basse que lors d'un traitement thermique et que le gradient de concentration existe dans l'évaporation qui rend la compréhension du phénomène d'encrassement plus difficile.

Dans ce contexte, le projet de thèse « Compréhension des mécanismes d'encrassements des protéines sériques par approche microfluidique et microscopique » a démarré en octobre 2022 par la doctorante Margot GROSTETE. Les données sont nombreuses concernant les mécanismes de formation des dépôts d'encrassement. Le travail réalisé jusqu'ici a démontré les dépôts de protéines sériques du lactosérum sur la surface étaient impactés par le taux de cisaillement et la concentration. Mon projet de stage de 14 semaines cherche à évaluer l'impact du cisaillement de la concentration sur la dénaturation/agrégation des protéines sériques, cette fois-ci en solution.

La méthodologie mise en œuvre consiste à réaliser des traitements de cisaillement à l'aide d'un rhéomètre et d'évaluer le niveau de dénaturation/agrégation des protéines par la microscopie, l'HPLC-DAD, la colorimétrie et la spectroscopie.

D'abord, mon organisme d'accueil, UMR STLO, INRAE, Institut Agro est présenté. Après une présentation détaillée de la méthodologie, les résultats obtenus sont présentés et discutés.

2. Organisme d'accueil

2.1. INRAE

INRAE (Institut National de Recherche pour l'Alimentation et l'Environnement) est né le 1^{er} janvier 2020 suite à la fusion de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et de l'IRSTEA (Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture).

C'est une organisation qui apporte connaissance, innovation, expertise et soutien aux politiques publiques, avec 18 centres de recherche au cœur des dynamiques régionales françaises et 14 départements animent des communautés de recherche multidisciplinaires (Figure 1).

Étant le 1^{er} organisme de recherche au niveau mondial spécialisé dans la vie, les humains et la planète, INRAE contribue à répondre à ces différents enjeux. En proposant de nouvelles orientations par la recherche, l'innovation et en accompagnant les politiques publiques pour soutenir l'émergence de systèmes agricoles et alimentaires durables, il a pour objectif d'apporter des solutions pour l'alimentation, l'agriculture et l'environnement.

INRAE a un fort impact mondial parce que les publications postées par des chercheurs d'INRAE sont plus citées d'environ 39% par rapport à la moyenne mondiale et ils font partis des 7 premières institutions mondiales pour 5 objectifs du développement durable (comme la baisse des émissions de gaz à effets de serre ou la protection de la biodiversité pour ne citer que cela).

En fusionnant deux établissements, l'INRA et l'IRSTEA, deux établissements reconnus pour la qualité et l'expertise de leurs recherches, INRAE a atteint une taille critique et fédéré d'importantes infrastructures de recherche, (observatoire, plateformes, bases de données), dont certaines sont uniques en Europe. Ce nouveau poste apporte une valeur ajoutée significative à INRAE dans différents domaines tels que les sciences de l'eau, les approches à l'échelle du territoire, la conservation et la restauration de la biodiversité, la prévision et la gestion des risques ou encore l'agriculture numérique.



Figure 1 : Quelques chiffres sur INRAE

Par ses chiffres, on remarque que INRAE est un acteur majeur dans le domaine de la recherche agricole. Il a à sa disposition un budget conséquent permettant la création de nombreux projets faisant avancer la recherche et donc la publication de nombreux articles. Ce budget est obtenu entre autres par les 5 Carnot : un Carnot est un institut de l'état labélisé qui finance les centres de recherche.

INRAE a pour ambition de s'engager écologiquement afin de créer l'agriculture de demain, c'est pourquoi il instaure 5 orientations scientifiques et 3 orientations politiques générales à réaliser d'ici 2030. Ses orientations scientifiques sont : répondre aux enjeux environnementaux et gérer les risques associés, accélérer les transitions agroécologique et alimentaire, une bioéconomie basée sur une utilisation sobre et circulaire des ressources, favoriser une approche globale de la santé, et mobiliser la science des données et les technologies du numérique au service des transitions. Ses orientations politiques sont : placer la science, l'innovation et l'expertise au cœur de nos relations avec la société pour renforcer notre culture de l'impact, être un acteur engagé dans les sites universitaires en France et un leader dans les partenariats européens et internationaux, et la stratégie responsabilité sociale et environnementale (RSE) : une priorité collective.

INRAE s'étend en Europe et à l'internationale avec la création d'environ 300 projets européens, 6 infrastructures européennes et 6 infrastructures européennes en projet. Il est également le 1^{er} bénéficiaire du programme H2020 qui est un programme sur la « sécurité alimentaire, agriculture et foresterie durables, recherches marines, maritimes et sur les eaux continentales, et bioéconomie ». Au niveau international, 2 projets prioritaires sont en cours et 4 projets en développement et il y a 25 partenariats avec des laboratoires internationaux. ^[1]

2.2 UMR STLO

L'UMR STLO (Unité Mixte de Recherche, Science et Technique du Lait et de l'Œuf) est une unité de recherche avec 4000 m² de laboratoires, 800m² d'installation expérimentale. Il y a 82 personnes dont 30 scientifiques permanents qui y travaillent à plein temps, 13 doctorants, 5 post-doctorants, environ 19 stagiaires par an et 15 à 20 personnels des cellules privées de recherche et développement hébergées.

Placée sous la tutelle conjointe d'INRAE et de l'Institut Agro Rennes-Angers, l'UMR est affiliée à deux départements de recherche INRAE : TRANSFORM (en tant que département pilote) et MICA (Microbiologie et Chaîne Alimentaire). Par ailleurs, elle est associée au département d'enseignement et de recherche Productions animales, agroalimentaire, nutrition (P3AN) de l'Institut Agro Rennes-Angers.

L'objectif principal de l'UMR STLO est de générer une compréhension globale des composants présents dans le lait et les œufs, ainsi que leur transformation en ingrédients ou en produits finaux destinés à la consommation humaine. Grâce à l'utilisation d'expertise dans

divers domaines tels que la biochimie, la physicochimie, le génie des procédés, la physique, la technologie, la microbiologie et la bio-informatique, l'objectif ultime est d'apporter une contribution significative au développement d'options alimentaires sûres, nutritives et respectueuses de l'environnement qui répondent aux besoins des différentes populations.

L'UMR est composé de 3 équipes : BN (Bio-activité et Nutrition), PSF (Procédé, Structure, Fonctionnalité) et Microbio (Microbiologie des filières laits et œufs). Les activités de l'UMR peuvent être regroupées sous 2 transversalités : Lait-Œuf-Végétal (LOVe) et FI (Amélioration des Formules Infantiles). Il y a également 2 équipes plateformes labellisées : la CIRM-BIA (Centre International de Ressource Microbiennes-Bactéries d'Intérêt Alimentaire) et la Plateforme Lait.

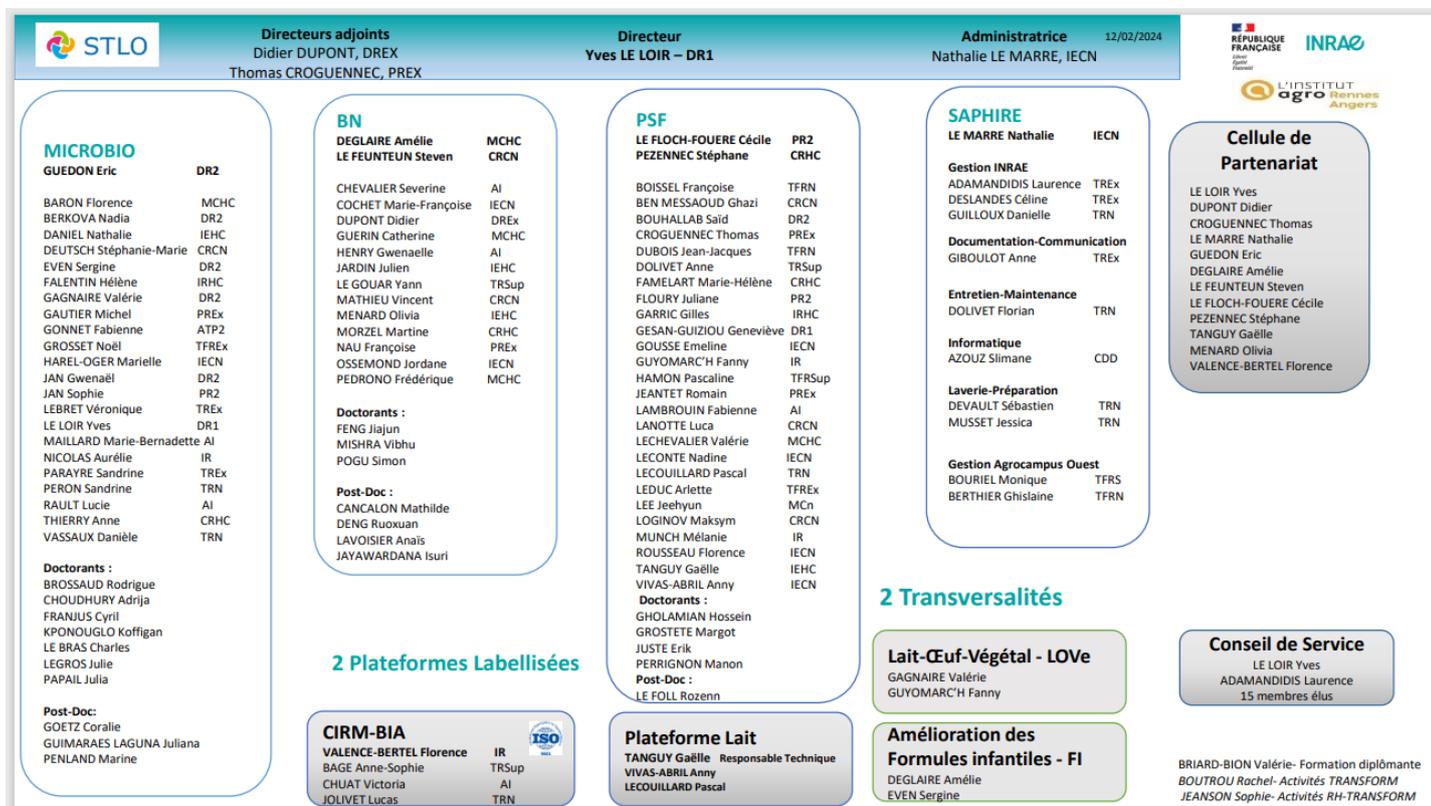


Figure 2 : Organigramme de l'UMR STLO

L'équipe BN a pour objectif de s'intéresser à la compréhension des mécanismes de digestion des aliments par des approches *in vivo* (étude précliniques et cliniques), *in vitro* (digestions statistiques, digesteurs dynamiques et modèles cellulaires) et *in silico* (modélisation mathématique) sur tous les types de population à savoir nourrisson, adulte sain et personne âgée. Il cherche à comprendre la déconstruction des produits laitiers de différents provenances (animale et végétale), à identifier les molécules bioactives lors du processus de digestion, et aussi déterminer l'impact que cela peut avoir sur la santé humaine.

L'équipe Microbio a pour objectif de comprendre les propriétés des bactéries, les interactions et le fonctionnement de communautés bactériennes dans les filières lait et œuf, et ce, depuis la production de la matière première, jusqu'à l'aliment chez le consommateur. Il contribue à développer des aliments sains, sûrs et bons ; développer des aliments à effets santé pour des populations cibles, diversifie les sources de protéines dans les aliments fermentés, Réduit les pertes et gaspillages, grâce à la fermentation et Développe des approches probiotiques de prévention des mammites chez les animaux producteurs de lait.

L'équipe PSF, dont j'ai fait partie durant mon stage, se focalise sur les mécanismes d'assemblage supramoléculaire et de séparation de phase, ainsi que sur les propriétés des systèmes colloïdaux lors des processus d'opérations unitaires (filtration, concentration par évaporation, séchage). Il travaille également sur les liens entre les variables opératoires et les performances des procédés alimentaires, et sur l'optimisation de la conception de la conduite et de l'enchaînement des opérations unitaires de transformation, et l'évaluation des impacts environnementaux correspondants. ^[2]

3. Matériels et méthodes

3.1. Préparation de la solution de protéines de lactosérum

5 g, 10 g et 12 g de poudre de WPI (Whey protein isolate, 89 % de protéines sériques) respectivement et un barreau aimanté ont été introduits dans un flacon Schott de 100 mL. L'eau mili-Q contenant de l'azoture de sodium (azide) à 0,02 % en masse a été préparée à part. 95 g, 90 g et 88 g de cette solution contenant de l'azide ont été respectivement ajoutés dans le flacon Schott afin d'avoir 100 g de solution de protéines de lactosérum à 5 %, 10 % et 12 % (p/p). Elles ont été agitées à 300 RPM (Rotations Par Minute) à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 24 h à température ambiante et puis stockées à 4 °C.

L'azoture de sodium sert ici à conserver la solution de protéines de lactosérum diluée environ 2 semaines. A noter que l'azoture de sodium est une substance CMR (Cancérogène, Mutagène ou toxiques pour la Reproduction).

3.2. Traitement de cisaillement des solutions de protéines de lactosérum

3.2.1. Matériels

Le rhéomètre Physica MCR 301 (Anton Paar), équipé d'un ondulateur, d'un bain marie et d'un système de rotation fonctionnant avec de l'air comprimé a été utilisé.

Le cisaillement de la solution de protéines de lactosérum a été réalisé en géométrie cône/plan (Figure 3). Pour cela, un cône en acier (diamètre = 49,963 mm, angle = 1.996 °, troncature = 209 µm) a été utilisée. Pour le plan, une lame en verre (diamètre = 50 mm) a été utilisé. Cette dernière était positionnée sur un socle en cuivre (CU/CX, diamètre = 50 mm). Ce socle était lui-même placé sur un module plan (P-PTD-200/80/1), pouvant faire varier la température de -40 °C à 200 °C avec une vitesse maximum de 40 °C.min⁻¹.

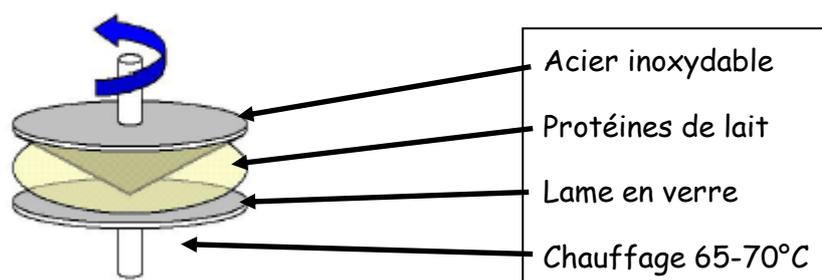


Figure 3 : Schéma d'une géométrie cône-plan ^[3]

3.2.2. Méthode de cisaillement

La solution de protéines de lactosérum a été agitée pendant 15 min puis environ 1 mL a été prélevé avec une pipette pasteur et introduit sur la lame en verre. Eventuelle bulle d'air présente dans la solution a été éliminée. La température du module plan a été portée à 75 °C pour avoir 65 °C au niveau de la solution de protéines de lactosérum (résultat préliminaire non présenté dans ce rapport). Le cône a été baissé jusqu'à l'entrefer 0. L'excédent de solution qui déborde a été essuyée. Au bout de 3 min, un taux de cisaillement a été appliqué pendant 10 min. La viscosité a été mesurée toutes les 6 s (soit 100 mesures au total). Puis, le plan a été refroidi à 40 °C en 3 min. Les taux de cisaillement choisis sont 0, 50, 100 et 175 s⁻¹. Le traitement de cisaillement a été réalisé 3 fois pour chaque concentration (5, 10 et 12 % (p/p)). L'acquisition et le traitement des données ont été réalisées à l'aide du logiciel Anton Paar RheoCompass.

A la fin du traitement, la solution cisailée a été récupérée avec une pipette pasteur et gardée dans un Eppendorf de 2 mL tandis que la lame en verre a été nettoyée avec de l'eau milli-Q avant d'être placée dans une boîte de Pétri puis mise à l'étuve. Après le séchage, elle a été replacée dans une boîte de Pétri jusqu'à l'observation microscopique. L'inset et le cône ont été rincés également à l'eau milli-Q sur un papier sans les enlever.

3.2.3. Précautions

Le rhéomètre a été étalonné avant chaque expérience. Une lame en verre est placée sur l'inset fixée avec 2 fines bandes de scotch double face puis l'entrefer 0 est fait afin de calibrer l'appareil sur la position où la géométrie (cône) devra descendre pendant l'expérience, c'est-à-dire à 209 μm de la lame en verre. La lame est fixée afin d'éviter son glissement lors de l'expérience.

Avant chaque expérience, les lames en verre ont été nettoyées, afin d'éliminer la poussière et éventuelle trace de protéine qui serait issue des expériences précédentes. Les lames nettoyées à l'eau savonnée avec une brosse à dents manuelle, puis rincée à l'eau distillée puis à l'éthanol et enfin à l'acétone. Elles sont ensuite ressuyées avec du papier Kimtech pour éviter de mettre des traces de doigts. Elles sont transportées dans des boîtes de Pétri nettoyées avec de l'eau et de l'éthanol et placées dans une étuve chauffée à 60 °C jusqu'à évaporation complète de l'acétone. Ce protocole a été adapté pour des solutions à 12 % en ajoutant une étape de nettoyage à eau savonnée avec une brosse à dents électrique et un lavage à bain à ultrason pendant 15 min.

3.3. Taux de dénaturation par HPLC-DAD

3.3.1. Préparation des échantillons et la gamme d'étalonnage

Les solutions de protéines cisailées et non traitées (non cisailées et non chauffées) ont été diluées à 1 % en volume dans l'eau distillée. 800 μL de cette solution diluée a été prélevé et mélangé avec 80 μL de tampon acétique acétate à 0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en vérifiant que le pH du tampon soit à 4,5. Cette solution a été chauffée à 30°C pendant 5min dans un bain marie puis centrifugée 10 min à 20 °C à 13000 g. Cette partie sert à faire précipiter les protéines dénaturées par éviter qu'elles bouchent la colonne. Ensuite, 100 μL de surnageant a été mélangé avec 900 μL d'une solution eau + TFA (Trifluoroacetic Acid) à 0,106 % en volume (solvant A). La solution a été filtrée avec un filtre à 0,45 μm et placée dans un Vial en verre adapté. Cette dernière étape sert à réduire la concentration en protéines pour éviter d'encrasser la colonne.

La gamme d'étalonnage a été préparé en prélevant 100 μL d'une solution étalon préparée à l'avance d' α -lac à 2,49 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et d' β -lg à 5,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avec 900 μL de solvant A, puis la solution a été filtrée avec un filtre à 0,45 μm et placée dans un Vial en verre. En faisant varier le volume d'injection (5, 10, 25 et 50 μL), la concentration des protéines sériques change donc une droite d'étalonnage est obtenue en traçant l'air du pic en fonction de la concentration en protéines sériques natives. Les échantillons sont dilués ainsi afin de ne pas encrasser la colonne, en effet une concentration d'environ 0,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ est recommandée.

3.3.2. Séparation et identification des protéines sériques par HPLC-DAD

Les protéines sériques (α -lac et β -lg) native ont été séparées et identifiées par HPLC ultimate 3000 (Thermo scientific), équipé d'un DAD (détecteur à barrette de diodes, 214 et 280 nm). Une colonne apolaire PLRP-S (Polymeric Reversed Phase-Silicon) (Agilent Technologies) de dimension 150*2,1 mm, avec des pores de 300 Å ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$) et des particules de silicones de 8 μm a été utilisée. Une pré-colonne a également été utilisée pour la sécurité de la colonne.

4 solvants utilisés sont : A) eau + TFA (Trifluoroacetic Acid) à 0,106 % en volume, à noter que le TFA est corrosif et toxique donc le manipuler avec des gants et sous une sorbonne ; B) acétonitrile +TFA à 0,1 % en volume ; C) isopropanol 5% et D) eau + acétonitrile 50 %. Ils ont été préparés en amont.

Les 5 modules (pompes, système injection, colonne, détecteur, puis onduleur) de l'appareil ont été allumés dans l'ordre et connectés au logiciel Chromelon. Le four a été allumé et mis à 40 °C. Les pompes ont été purgées avec 100 % de solvant A puis 100 % de solvant B et enfin 100 % de solvant C avec un débit de 3 mL.min⁻¹ (pression = 20 – 100 bar). Allumer ensuite la lampe UV puis procéder à la purge de la seringue, de la boucle d'injection et de l'extérieur de l'aiguille. Le débit des solvants (84 % de solvant A et 16 % de solvant B) a ensuite été réglé à 0,2 mL.min⁻¹.

Les gradients de concentration de chaque solvant est illustré en Figure 4.

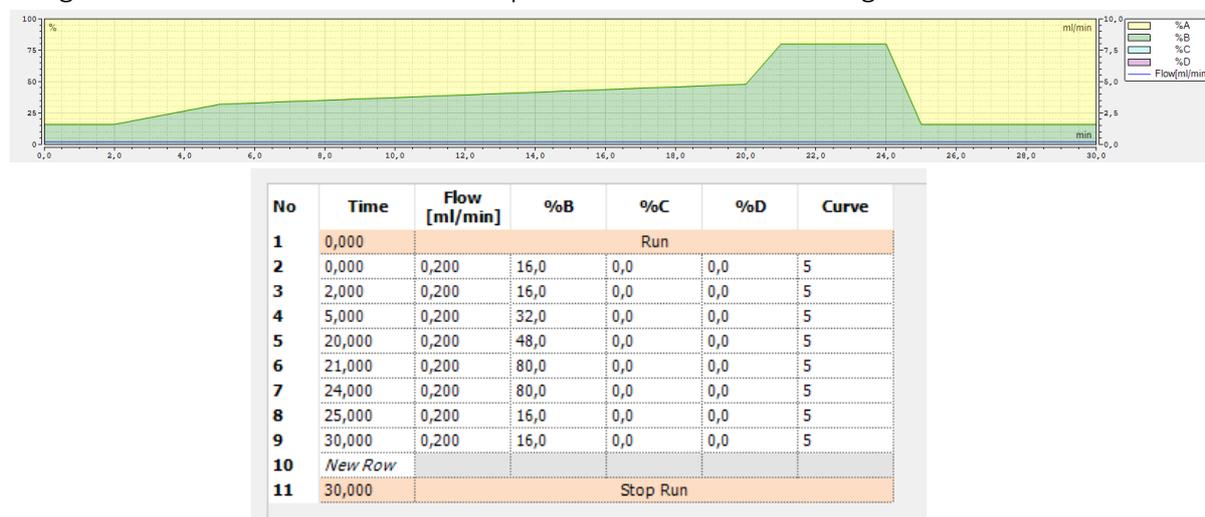


Figure 4 : Représentation de la méthode d'injection avec gradient de débit

Le volume d'injection était de 50 μL et 2 blancs de solvant A entre la gamme d'étalonnage et les série d'échantillons ont été analysés afin de nettoyer la colonne. Un chromatogramme a duré 30 min. Les protéines ont été identifiées à 214 nm (α -lac = 19 min, β -lg = 23 min). La colonne a été nettoyé à la fin avec du solvant A avec un débit de 0,2 mL.min⁻¹ pendant 41 min.

3.3.3 Quantification des protéines sériques

Les aires des pics pour chaque échantillon sont récupérées et grâce aux courbes d'étalonnage, les concentrations en protéines sériques sont calculées en divisant l'air du pic de la protéine correspondante par la pente de la courbe d'étalonnage. La concentration obtenue est multiplié par les facteurs de dilution appliqué lors de la préparation des échantillons, c'est la concentration en protéines natives qui est obtenue. En soustrayant la concentration native des échantillons cisailés de la concentration native des échantillons non traitées, la concentration en protéines dénaturées est obtenue. Il suffit enfin de diviser la concentration en protéines dénaturées par la concentration en protéines natives correspondante pour obtenir le taux de dénaturation.

3.4. Indice de brunissement par mesure colorimétrique

3.4.1. Mesure des coordonnées L, a*, b*

Les coordonnées L, a* et b* des solutions cisailées et non traitées ont été mesurées avec le colorimètre CR400/410 (Chroma Meter). Afin d'avoir un volume uniforme pour chaque mesure, il a été convenu d'utiliser un volume de 1,3 mL donc faire 2 manipulations de même paramètre pour obtenir ce volume, ce qui porte le nombre final de manipulations à 24 pour une même concentration.

L'appareil a été étalonné en le plaçant sur un socle blanc. Il a été placé 1,3 mL de solution dans une boîte de Pétri de 3,5 cm de diamètre et 1 cm de hauteur, ensuite la boîte a été placée dans un socle noir fourni avec l'appareil. Un anneau noir a été posé au-dessus de la boîte de Pétri pour focaliser la mesure sur la solution. L'appareil prend 3 mesures, fait la moyenne des 3 mesures et affiche les valeurs L, a* et b*. Les valeurs L, a*, b* étant des coordonnées de l'espace Cielab 1974 représentant une sphère chromatique. Pour des questions de répétabilité, il faut prendre 3 valeurs de L, a* et b* puis faire la moyenne des ses mesures.

3.4.2. Calcul de l'indice de brunissement

Avec les coordonnées L, a*, b*, le calcul de l'indice de brunissement a été effectué avec la formule suivante ^[4] :

$$X = \frac{a^* + 1,75 \times L}{5,645 \times L + a^* - (b^* \times 3,012)} \quad IB = \frac{100(X - 0,31)}{0,17}$$

3.5. Turbidité par mesure spectroscopique

3.5.1. Préparation des échantillons

La turbidité des solutions cisillées et non traitées a été mesurée avec le UV mc². Des cuves en plastiques ont été employées pour mesurer les absorbances car les mesures ont été réalisées à une longueur d'onde de 600 nm. Les cuves font 1 cm de largeur et peuvent contenir environ 3 mL. ^[5]

L'appareil a été étalonné en mettant 2 cuves d'eau distillée : une dans la référence et l'autre le compartiment échantillon à analyser. Pour avoir une valeur correcte d'absorbance par rapport aux limites de l'appareil, il est recommandé de se placer entre 0,01 et 1 en absorbance donc de diluer les solutions si besoin surtout pour les solutions de 10 % et 12 % (p/p) en protéines sériques de lactosérum. La solution à 5 % de protéines sériques de lactosérum n'a pas été diluée et a été mesurée directement mais la solution de 10 % de protéines de lactosérum a été diluée au 5^{ème} c'est à dire 0,5 mL de solution à 10 % cisillée avec 2,0 mL d'eau distillée. Quant à la solution de 12 % en WPI, elle a été diluée au 11^{ème} c'est à dire 0,2 mL de solution à 12 % avec 2,0 mL d'eau distillée.

Contrairement aux autres méthodes, seulement une mesure d'absorbance a été prise par manque de temps donc il n'y a pas d'écarts types pour cette méthode.

3.5.2. Calcul de la turbidité

La turbidité a été calculée à partir des valeurs d'absorbance, recalculées en prenant en compte le facteur de dilution respectif. Le calcul est le suivant : $t = 2,303 * A_{600nm} / l$ avec t la turbidité en cm⁻¹, et l la largeur de la cuve en cm donc ici l = 1. ^[6]

La turbidité est une teneur d'un fluide en matière qui le trouble. Une solution qui se trouble est liée au nombre de particules de protéines dénaturées et agrégées présentes dans la solution.

3.6. Prise d'images par observation microscopique

La visualisation des lames et des solutions a été faite sur le microscope optique (Olympus/numérique VHX 7000/7000N (Keyence)). Les lames ont été placées 30 minutes dans une étuve à 50 °C pour qu'elles sèchent puis elles sont directement observées au microscope.

Pour les solutions, il faut d'abord nettoyer les lames pour la microscopie à l'éthanol puis placer 5 µL de la solution sur la lame microscopique. Ensuite, la solution est recouverte d'une lamelle

et un temps de décantation d'une heure est appliqué puis les solutions sont observé au microscope.

Une autre méthode a été utilisé pour distinguer les protéines dénaturées de la poussière qui pourrait subsister. Cette méthode consiste à ajouter 60 μL de solution de thioflavine T dans 50 mL de solution de protéines de lactosérum avant de faire les expériences au rhéomètre. La thioflavine T permet de rendre fluorescent uniquement les protéines dénaturées mais elle est sensible au rayon lumineux donc il faut protéger le matériel utilisé (Eppendorf, flacon Schott, boîte de Pétri, etc...) de papier aluminium et de travailler dans l'obscurité.

5 μL de solution traitée et non traitée est ensuite mise sur une lame pour la microscopie préalablement nettoyée à l'éthanol puis la solution est recouverte d'une lamelle et un temps de décantation de 1 h est nécessaire avant l'observation au microscope.

Afin, les lames sont observées sur le microscope BX51 (Olympus) avec le logiciel Archimed en appliquant un filtre à 480 nm car la thioflavine T émet un fort signal fluorescent à cette longueur d'onde quand elle est excitée.

Mon stage ne se portant pas sur des analyses de surfaces, je n'ai fait que prendre des images avec le microscope mais ses images servent à déterminer la taille et le nombre de protéines dénaturées/agrégées pour différentes solutions de protéines sériques de lactosérum ayant subis ou non un taux de cisaillement.

4. Discussions et résultats

4.1 La viscosité

L'évolution de la viscosité en fonction du temps pour les solutions à différentes concentrations, cisillées à des taux de cisaillements différents est présentée dans la Figure 5.

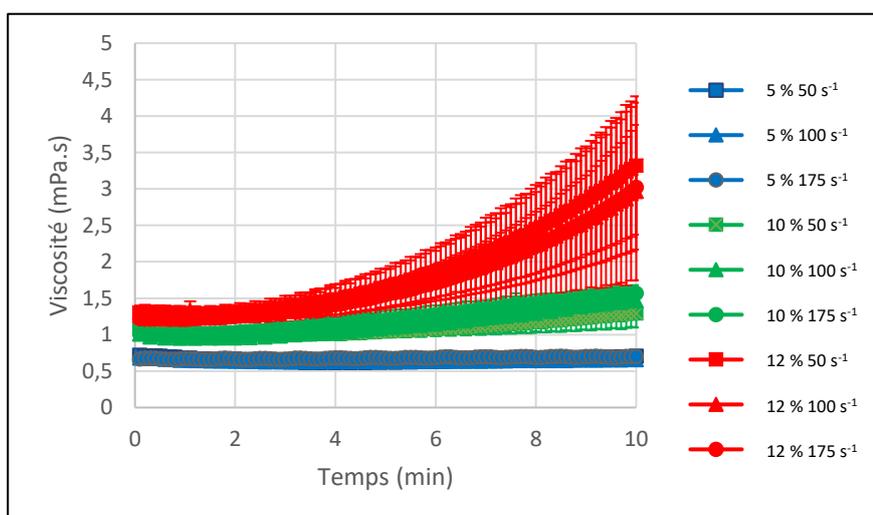


Figure 5 : Viscosité des solutions de protéines de lactosérum à différentes concentrations (5 % bleu ; 10 % vert ; 12% rouge) cisillées à 65 °C, à différents taux de cisaillement (50, 100, 175 s⁻¹) en fonction du temps (n = 3)

Il n'y a pas de courbe pour un taux de cisaillement de 0 s⁻¹ car la viscosité est difficilement mesurable quand il n'y a pas de taux de cisaillement.

Il y a un écart de valeur entre la viscosité de chaque concentration même si les écarts types sont très importants parfois du fait de la variabilité des conditions expérimentales (air ambiant et propreté de la lame) et la forme des courbes n'est pas la même en fonction des concentrations. Pour 5 % (p/p) c'est plutôt une forme constante, en suggérant très peu d'évolution de la viscosité au cours du traitement (10 min). Pour 10 % (p/p) c'est plutôt une forme linéaire croissante car les protéines sériques se dénaturent/s'agrègent ce qui fait augmenter la viscosité alors que pour 12 % (p/p) c'est plutôt une forme exponentielle croissante. On peut l'expliquer du fait que le gel commence à se former à cette concentration « limite ». Par ailleurs, on observe que la solution devient trouble et opaque à la fin du traitement. Par conséquent, la concentration en protéines de lactosérum a une influence sur la viscosité de la solution. Il est plus compliqué de statuer sur l'impact du taux de cisaillement du fait des écarts types mais il semblerait que le taux de cisaillement n'a pas ou très peu d'impact sur la viscosité.

4.2. Le taux de dénaturation

La teneur en β -lactoglobuline et α -lactalbumine a été déterminée par l'étalonnage externe une fois séparées par l'HPLC. D'abord, une courbe d'étalonnage (Titre d'exemple, Figure 6) a été établie pour chacune de ces deux protéines sériques en utilisant une solution standard. Les aires de pic intégrées des échantillons ont été converties en concentration grâce à l'équation de la régression linéaire de ces courbes.

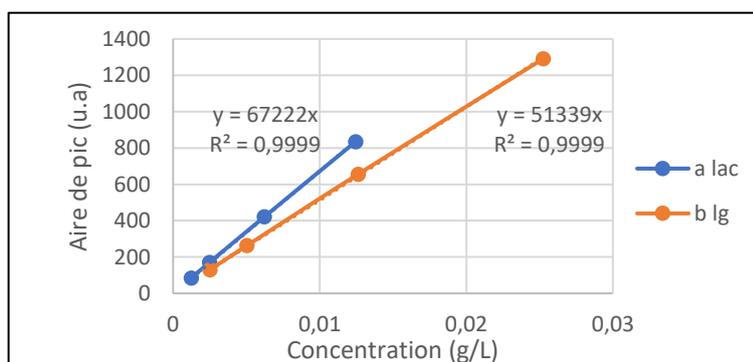


Figure 6 : Exemple de courbe d'étalonnage de l' α -lac et de la β -Ig pour une solution de 10 % (p/p) en protéines de lactosérum

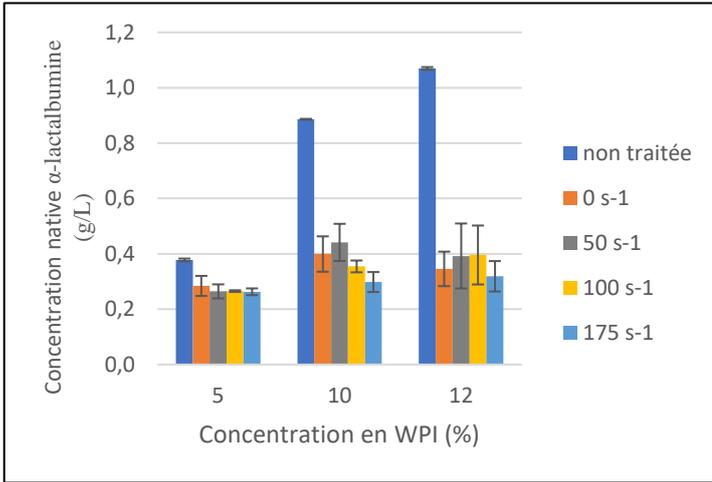


Figure 7: Histogramme de la concentration en protéines natives d'α lac en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements

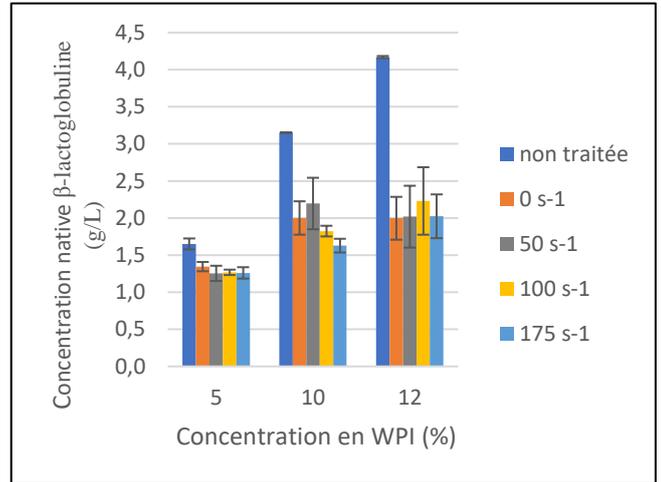


Figure 8: Histogramme de la concentration en protéines natives de β Ig en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements

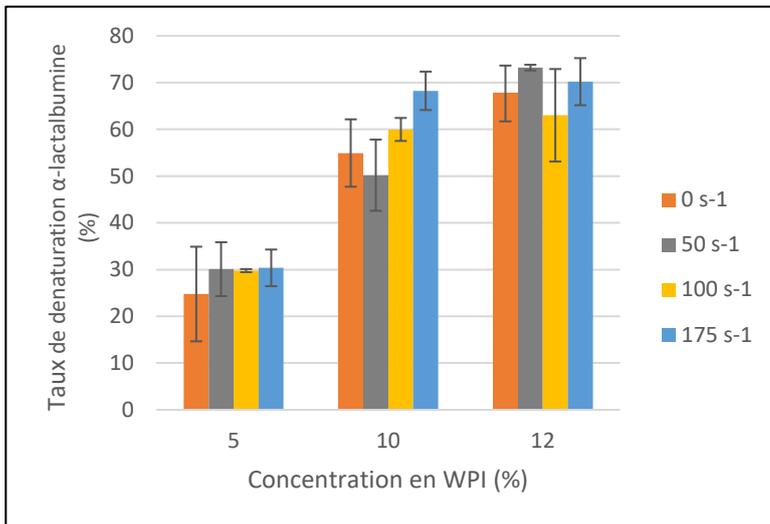


Figure 9: Histogramme du pourcentage de protéines dénaturées d'α lac en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements (n = 3)

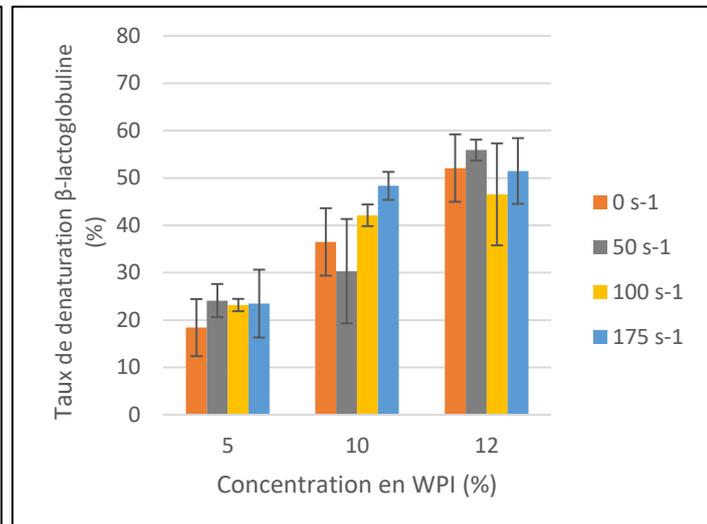


Figure 10: Histogramme du pourcentage de protéines dénaturées de β Ig en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements (n = 3)

La solution non traitée correspond à celle qui n'a été ni chauffée à 65°C ni cisailée. La teneur en protéines sériques est élevée pour les solutions non traitées, ce qui est attendu. Dès que les solutions sont traitées thermiquement, le niveau de dénaturation/agrégation augmente. On remarque également que les pourcentages de protéines dénaturées ne sont pas les mêmes entre les 2 protéines sériques pour une même concentration en protéines de lactosérum. En effet, le pourcentage en protéines dénaturées est plus faible pour la β-Ig, cela s'explique par une structure plus complexe de la β-Ig.

Comme pour les courbes de viscosité, on constate que le taux de cisaillement ne fait pas beaucoup varier le pourcentage en protéines dénaturées (en tenant compte des écarts types) pour une même concentration en protéines de lactosérum néanmoins on remarque que le

pourcentage de protéines dénaturées augmente quand la concentration en protéines de lactosérum augmente. Donc la concentration en protéines de lactosérum a une influence sur la quantité de protéines dénaturées alors que le taux de cisaillement n'en a pas.

4.3. L'indice de brunissement

La différence de couleur entre les solutions non traitées et traitées est déjà visible à l'œil nu. Les solutions traitées sont plutôt blanchâtres (Figure 11) alors que les solutions non traitées sont plutôt jaunes (Figure 12). Cependant, il est impossible de différencier à l'œil nu la couleur des solutions traitées.



Figure 11 : Image d'une solution de protéines de lactosérum à 10 % (p/p) traitée au rhéomètre



Figure 12 : Image d'une solution de protéines de lactosérum à 10 % (p/p) non traitée au rhéomètre

L'indice de brunissement a été calculé à partir des coordonnées L, a* et b* et est représenté dans la Figure 13.

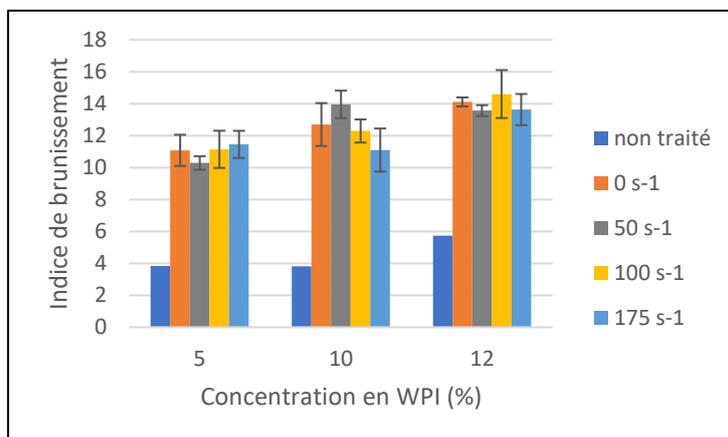


Figure 13 : Histogramme de l'indice de brunissement en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillements (n = 3)

L'indice de brunissement augmente quand la concentration en protéines de lactosérum augmente alors qu'il ne fluctue pas ou très peu quand le taux de cisaillement change donc seule la concentration semblerait influencer l'indice de brunissement. L'écart de valeur entre

les concentrations de protéines de lactosérum est moins important que pour les résultats de l'HPLC donc il est plus difficile de conclure avec ces résultats.

4.4. La turbidité

La turbidité calculée à partir des mesures d'absorbance des solutions est présentée sur la Figure 14.

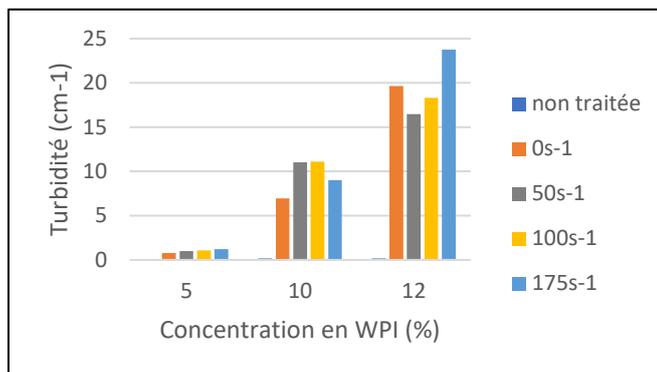


Figure 14 : Histogramme de la turbidité en fonction de la concentration en protéines de lactosérum pour différents taux de cisaillement ($n = 1$)

La turbidité représente indirectement le niveau d'agrégation (taille ou/et nombre des agrégats) des protéines qui est responsable du trouble. La turbidité des solutions non traitées a bien été mesurée mais leur valeur était très faible, ce qui est attendu. On constate que la turbidité augmente quand la concentration en protéines de lactosérum augmente mais elle varie peu quand le taux de cisaillement change donc la concentration en protéines de lactosérum influence la valeur de turbidité contrairement au taux de cisaillement. Il est donc raisonnable de conclure que soit le nombre ou bien la taille des agrégats augmente avec la concentration en protéines mais peu avec le taux de cisaillement. Cependant, cette première tendance est à confirmer en diluant les échantillons à la même fraction volumique pour que les résultats soient comparables et en réalisant plusieurs répétitions.

5) La microscopie

Les solutions récupérées du rhéomètre à l'issue du traitement ont été observées par un microscope optique (Figure 15). De plus, les solutions traitées dans lesquelles une sonde fluorescente (thiofalcone T) est présente, ont été observées (Figure 16).

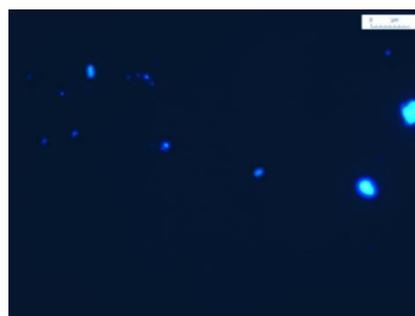
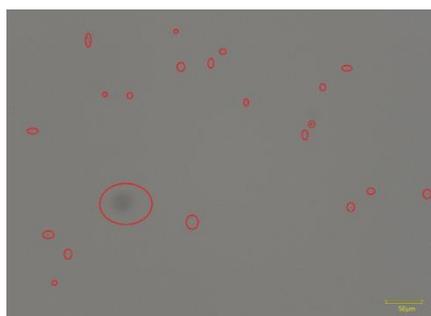


Figure 15 : Image du microscope Keyence d'une solution de protéines de lactosérum à 10 % (p/p) traitée au rhéomètre avec un taux de cisaillement de $100s^{-1}$

Figure 16 : Image du microscope Olympus d'une solution de protéines de lactosérum à 10 % (p/p) avec ajout de thioflavine T traitée au rhéomètre avec un taux de cisaillement de $100s^{-1}$

Les figures 15 et 16 sont présentées ici à titre d'exemple. On constate que la distribution de la taille des protéines dénaturées/agrégées n'est pas homogène. On remarque également les protéines dénaturées/agrégées sont plus facilement visibles grâce à la thioflavine T ce qui évite de confondre avec les poussières. L'observation qualitative semble corroborer les tendances déjà observées de l'effet de la concentration et du taux de cisaillement. La taille et le nombre des protéines dénaturées par l'analyse d'image sont envisagés.

Conclusion

La viscosité des solutions sous l'action de différents cisaillements, leur taux de dénaturation/agrégation, l'indice de brunissement et la turbidité ont été étudiés. Grâce aux résultats obtenus, on en déduit que la dénaturation et l'agrégation des protéines sériques du lait en solution est favorisée par la concentration en protéines de lactosérum présente dans la solution.

Le taux de cisaillement quant à lui n'a pas ou très peu d'influence sur la quantité de protéines dénaturées et d'agrégats pour les taux de cisaillement qui ont été utilisés.

En perspective, il reste à répéter les mesures d'absorbance pour les mêmes paramètres de concentration en protéines de lactosérum et de taux de cisaillement, afin de pouvoir analyser les résultats de manière statistique.

Bilan Personnel

Je trouve que mon stage s'est bien passé, j'ai bien aimé ce que j'ai fait. J'ai pu découvrir un milieu que je ne connaissais peu qui est la biologie au travers d'animation scientifique sur divers sujets assez poussé autour du lait. Grâce à ce stage, j'ai pu gagner en autonomie et approfondir ma bonne pratique de laboratoire.

Liste des références

[1] INRAE, janvier 2024

[2] UMR STLO Rennes, janvier 2024

[3] Muhaz.org Rhéométrie des suspensions - Thèse de doctorant

[4] Influence of storage conditions on the functional properties of micellar casein powder, Nasser S, Moreau A, Jeantet R, Hédoux A et Delaplace G, 2018

[5] Scale-up production of vitamin loaded heteroprotein coacervates and their protective property ». Chapeau Anne-Laure, Hamon Pascaline, Rousseau Florence, Croguennec Thomas, Poncelet Denis, et Bouhallab Saïd *Journal of Food Engineering* 206, 2017

[6] Turbidimetric Determination of Particle Size Distributions of Colloidal Systems, Melik, D H 1983