



Comportement de la matière (molle) sous la contrainte d'un procédé de transformation : interactions, structuration, modélisation. De la filtration du lait à la déconstruction de la biomasse lignocellulosique

Antoine Bouchoux

► To cite this version:

Antoine Bouchoux. Comportement de la matière (molle) sous la contrainte d'un procédé de transformation : interactions, structuration, modélisation. De la filtration du lait à la déconstruction de la biomasse lignocellulosique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2017. tel-02789676

HAL Id: tel-02789676

<https://hal.inrae.fr/tel-02789676>

Submitted on 5 Jun 2020

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 - ShareAlike 4.0 International License

Comportement de la matière (molle) sous la contrainte d'un procédé de transformation : Interactions, structuration, modélisation

De la filtration du lait à la déconstruction de la biomasse lignocellulosique

Antoine Bouchoux

Chargé de recherche INRA 1^{ère} classe

Laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés / LISBP

UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSA

Toulouse



Sommaire

Sigles et abréviations	9
1 Formation et parcours	11
<i>Toulouse → Rennes → Toulouse</i>	
1.1 Parcours universitaire et de chercheur	11
1.2 Publications	13
1.3 Encadrement	17
1.4 Implication dans des programmes de recherche financés	23
1.5 Animation de la recherche, responsabilités collectives	25
2 Activités de recherche	29
<i>Procédés de filtration, micelle de caséine... et matière molle</i>	
2.1 Mécanismes de sélectivité de membranes synthétiques et biologiques	29
2.2 Comprendre et modéliser la filtration du lait	35
2.2.1 Problématique et stratégie adoptée	35
2.2.2 Suspensions concentrées de micelles de caséine	39
2.2.3 Description et modélisation de la filtration	53
2.3 Structure de la micelle de caséine	59
2.4 Interactions et structuration aux fortes concentrations	63
2.4.1 Protéines globulaires	63
2.4.2 Microgels	65
3 Perspectives de recherche	69
<i>Catching enzymes in action: Soft matter approaches to enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass</i>	
3.1 Contexte et questions	69
3.2 Approche expérimentale et conceptuelle	75
3.3 Moyens	87
4 Conclusion	89
5 Références	91
Annexes	101
A Curriculum vitæ	103
B Autres produits de la recherche : séminaires, publications à diffusion restreinte	107
C Copie de 5 publications significatives	121
C-1 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2009	123
C-2 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2010	147
C-3 Ouanezar et al., Langmuir, 2012	175
C-4 Bouchoux et al., Langmuir, 2014	189
C-5 Pasquier et al., Physical Chemistry Chemical Physics, 2016	207

Sigles et abréviations

AFM	Microscopie à force atomique
AMC2	GdR CNRS 2980 approches multi-physiques pour les colloïdes concentrés
ANR	Agence nationale de la recherche
ANS	Programme d'actions nouvelles soutenues du département CEPIA
BBA	Bretagne biotechnologie alimentaire, association d'industriels laitiers
BSA	Bovine serum albumin
CBM	Carbohydrate binding module
CEPIA	Département INRA caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture
CIRIMAT	Centre interuniversitaire de recherche et d'ingénierie des matériaux, UMR 5085 INP-CNRS-UPS, Toulouse
CNRS	Centre national de la recherche scientifique
CPER	Contrat de plan État-région
CR2	Chargé de recherche 2 ^{ème} classe
DR	Directeur de recherche
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ENSIC	Ecole nationale supérieure des industries chimiques, Nancy
EUDIME	Programme européen erasmus mundus doctorate in membrane engineering
FAST	Laboratoire fluides, automatique et systèmes thermiques, UMR 7608 CNRS-Université de Paris-Sud, Orsay
FERMaT	Fédération de recherche fluides, énergie, réacteurs, matériaux et transferts
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GIMD	Département génie des interfaces et des milieux divisés du LGC
ILL	Institut Laue-Langevin, Grenoble
IMFT	Institut de mécanique des fluides, UMR 5502 INP-CNRS-UPS, Toulouse
INRA	Institut national de la recherche agronomique
INSA	Institut national des sciences appliquées
INP	Institut national polytechnique de Toulouse
IPR	Institut de physique de Rennes, UMR 6251 CNRS-Université Rennes 1, Rennes
IRSTEA	Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture
ITAV	Institut des technologies avancées en sciences du vivant, USR 3505 CNRS, Toulouse
IUPAC	International union of pure and applied chemistry
JCJC	Programme jeunes chercheuses et jeunes chercheurs de l'ANR
LAAS	Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes, UPR 8001 CNRS, Toulouse
LAPLACE	Laboratoire plasma et conversion d'énergie, UMR 5213 INP-CNRS-UPS, Toulouse
L2C	Laboratoire Charles Coulomb, UMR 5221 CNRS-Université Montpellier, Montpellier
LGC	Laboratoire de génie chimique, UMR 5503 INP-CNRS-UPS, Toulouse
LISBP	Laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés, UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSA, Toulouse
MEB	Microscopie électronique à balayage
MF	Microfiltration
NHS	N-hydroxysuccinimide

NPC	Nuclear pore complex
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
PNiPAM	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)
QCM-D	Microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPI	Rensselaer polytechnic institute, Troy, NY, USA
SANS	Small-angle neutron scattering
SAXS	Small-angle x-ray scattering
SEC-MALS	Chromatographie d'exclusion de taille avec détection par diffusion de la lumière à plusieurs angles
SEVAB	Ecole doctorale sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques, bioingénierie, université Paul Sabatier, INP Toulouse, INSA Toulouse
SPR	Technique de résonance des plasmons de surface
STLO	Laboratoire science et technologie du lait et de l'œuf, UMR 1253 INRA-AGROCAMPUS OUEST, Rennes
TIM	Equipe transfert, interface, mélange du LISBP
TIPIL	Equipe procédés pour l'industrie laitière du STLO
TWB	Toulouse white biotechnology, UMS 1337/3582 INRA-CNRS-INSA, Toulouse
UF	Ultrafiltration
UMET	Unité matériaux et transformations, UMR 8207 CNRS-université Lille 1
UMR	Unité mixte de recherche
UMS	Unité mixte de service
UPS	Université Paul Sabatier, Toulouse
USR	Unité de service et de recherche
UTWENTE	Université de Twente, Pays-Bas
WUR	Université de Wageningen, Pays-bas

1 Formation et parcours

Toulouse → Rennes → Toulouse

1.1 Parcours universitaire et de chercheur

Mon parcours scientifique, sans être véritablement atypique, est riche en événements et changements de différentes natures. Je le résume rapidement ci-dessous. Ses grandes lignes sont données dans mon CV en annexe A.

A l'issue de deux années de classes préparatoires aux grandes écoles à Orsay, j'ai intégré l'ENSIC de Nancy pour y suivre une formation d'ingénieur en génie des procédés. Ma formation à la recherche a commencé en DEA (diplôme d'études approfondies) en dernière année de cette école en 2001. Mon projet de recherche était alors - de façon toute fortuite - lié à des thématiques que j'allais aborder plus tard comme chercheur puisqu'il s'agissait de contribuer au meilleur fonctionnement d'une ligne de production de munster en Lorraine (!). A la suite de cette première expérience, je me suis engagé dans un travail de thèse en génie des procédés au LGC de Toulouse sous la direction d'Hélène Roux-de Balmann et financé par le CNRS et l'entreprise Eurodia. Le projet reposait essentiellement sur des problématiques industrielles d'intégration d'une opération de filtration, la nanofiltration, dans les procédés de production d'acide lactique. Il s'est avéré également passionnant du point de vue scientifique avec la mise en évidence de phénomènes de sélectivité jusqu'alors peu connus en filtration membranaire. Après la thèse, j'ai rejoint le groupe de Georges Belfort aux Etats-Unis (RPI) pour un séjour postdoctoral. Le lien avec la filtration membranaire était ténu et le contraste avec mon travail de thèse à peu près total. Mon travail consistait en effet à étudier les mécanismes de sélectivité d'une machine biologique macromoléculaire, le *nuclear pore complex*, par microscopie à force atomique. Ce fut là mon premier contact avec des objets protéiques et des approches de type biophysique. L'expérience fut réellement enrichissante. Mais elle est restée relativement brève (9 mois) suite à mon succès au concours INRA quelques mois après mon arrivée aux Etats-Unis.

Admis au concours d'entrée 2005, je suis rentré à l'INRA le 1^{er} janvier 2006 en tant que CR2 au laboratoire STLO à Rennes. L'idée de ce recrutement était de renforcer les activités filtration du STLO alors portées par une seule scientifique, Geneviève Gésan-Guiziou. L'objectif scientifique était de parvenir à maîtriser les opérations de filtration membranaire utilisées dans les industries laitières, avec la volonté de modéliser et de prédire leur fonctionnement. J'ai choisi d'aborder cette problématique à travers une caractérisation fine des phénomènes d'interactions et de structuration dans les solutions concentrées de protéines laitières que l'on retrouve à la surface des membranes de filtration. Ma conviction était alors - et est encore - qu'une caractérisation de ce type, aux petites échelles (du nm au micron), était indispensable pour décrire et modéliser le procédé de façon efficace et réaliste. Cette démarche, complémentaire des approches classiques en génie des procédés, était alors relativement novatrice au STLO. Elle nécessitait de se confronter et de s'ouvrir à des notions de physique des colloïdes et de la matière molle qui m'étaient peu familières à mon arrivée à Rennes. J'y suis parvenu en particulier grâce au *mentorship* précieux et bienveillant de Bernard Cabane, chercheur à l'ESPCI, et à l'accompagnement de certains chercheurs du STLO dont Stéphane Pezennec (INRA). J'ai développé mon programme de recherche alliant génie des procédés et physique des colloïdes pendant près de six années au STLO de 2006 à 2011. Au cours de cette

période, mes collègues (dont Peng Qu, doctorant 2009-2012) et moi-même avons démontré que l'approche était pertinente avec de premiers résultats importants quant au comportement de la micelle de caséine, protéine majoritaire du lait, aux fortes concentrations. Sur cette même période, j'ai également travaillé à l'élucidation de la structure interne de la micelle de caséine et à la caractérisation des interactions entre protéines globulaires aux fortes concentrations, toujours par des approches de type (bio-)physique.

En juin 2011, j'ai souhaité effectuer une mobilité de Rennes vers Toulouse pour raison familiale. Cette mobilité m'a été accordée dans le cadre d'une convention d'accueil entre le STLO, le LGC, et le LISBP. Cette convention prévoyait (i) un accueil au LGC d'octobre 2011 à octobre 2013 tout en restant affecté au STLO, (ii) mon affectation au LISBP le 1^{er} octobre 2013. L'objectif de ce "retour" de deux ans au LGC était de finaliser mes travaux sur la filtration du lait et les liens entre propriétés colloïdales de la matière et modélisation du procédé. Le choix du LGC était en ce sens stratégique puisque ce laboratoire est historiquement impliqué dans des approches combinant génie des procédés et physique de la matière molle à travers les travaux de Martine Meireles (CNRS) et Patrice Bacchin (UPS) notamment. En plus de valoriser certains travaux démarrés au STLO, mon passage au LGC m'a d'ailleurs permis de travailler à la modélisation de la filtration du lait en collaboration avec P. Bacchin et à partir de modèles que ce dernier a contribué à faire émerger. Par ailleurs, c'est au cours de ces deux années que Martine Meireles et moi-même avons commencé à travailler sur le comportement générique en filtration d'objets poreux et déformables de type microgel. Ce travail s'est concrétisé par une thèse en codirection qui a démarré fin 2013 (Izabella Bouhid de Aguiar).

J'ai donc intégré le LISBP le 1^{er} octobre 2013. J'y ai rejoint l'équipe TIM dont les recherches relèvent du génie des procédés et plus particulièrement de la mécanique des fluides, de la modélisation des procédés et de la physico-chimie. Comme convenu avec l'INRA/CEPIA, le STLO et le LISBP, cette nouvelle affectation devait nécessairement s'accompagner d'un changement de thématique : la thématique de la filtration du lait ne pouvant être traitée en dehors du STLO, et le LISBP n'ayant pas vocation à s'intéresser à de telles problématiques. Le choix de cette nouvelle thématique me revenait complètement et j'ai décidé de m'orienter vers des questions relevant de la valorisation de la biomasse lignocellulosique et des procédés de dégradation enzymatique de la lignocellulose. Il me semblait en effet que les techniques et approches que j'avais utilisées et développées au STLO et au LGC pouvaient permettre de mieux appréhender certains mécanismes élémentaires de la dégradation d'un substrat par des enzymes. Depuis mon affectation au LISBP, l'objectif essentiel de mes recherches est de caractériser l'action d'enzymes lignocellulolytiques dans des situations modèles reproduisant une ou plusieurs caractéristique(s) d'un substrat complexe lignocellulosique. La démarche est la même que celle adoptée pour comprendre la filtration d'un lait. Il s'agit de caractériser le système en cours de transformation, aux petites échelles (du nm au micron), et en termes de structure, interactions, et propriétés mécaniques. L'idée est ensuite de revenir au procédé enzymatique en tant que tel et d'utiliser ses informations pour mieux le décrire, le modéliser, et en proposer des voies d'amélioration. Je travaille sur ce projet en collaboration avec des chercheurs du LISBP spécialisés en ingénierie enzymatique, Claire Dumon et Cédric Montanier, tous deux CR INRA. C. Dumon et moi-même encadrons depuis septembre 2016 le travail d'une doctorante INRA-Région Occitanie sur le sujet, Lucie Dianteill. Enfin, en dehors de cette thématique principale, je conserve bien sûr un intérêt pour mes thématiques précédentes et continue de collaborer sur des questions diverses avec des collègues du STLO, du LGC et d'autres laboratoires.

1.2 Publications

Je suis l'auteur ou le co-auteur de 16 articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture dont 8 en tant que premier auteur et 12 en tant qu'auteur correspondant. Au 1^{er} mars 2017, ces articles ont reçus 360 citations selon ISI Web of Science (<http://www.researcherid.com/rid/E-9111-2010>) et 476 selon Google Scholar (<https://scholar.google.fr/citations?user=B30sftYAAAAJ>). Le *h-index* - indicateur à la signification toute relative - est de 10 dans les deux cas.

Ces articles sont listés ci-dessous avec également les articles publiés dans des revues nationales à comité de lecture et les articles soumis ou en préparation. Mes communications dans des congrès et colloques sous la forme de présentations orales (27 au total) et de posters (23) sont données en annexe B.

Mon implication a toujours été importante voire centrale dans l'ensemble des travaux cités ci-dessous. Je ne recense qu'un article (AI7) en marge de mes activités principales et pour lequel ma participation s'est limitée à la réalisation et l'interprétation d'expériences AFM. Dans les autres cas, je suis soit à l'origine des travaux publiés, soit partie prenante des projets, avec toujours l'implication qu'il se doit dans l'analyse des résultats, leur interprétation et la rédaction des articles. Il s'agit je pense d'une caractéristique essentielle et relativement singulière de ma production scientifique.

Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture

- AI16 *How molecular crowding enhances protein stabilization of amorphous calcium orthophosphate: the casein case*
P. De Sa Peixoto^a, J. Valle Costa Silva, G. Laurent, M. Schmutz, D. Thomas, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guizieu*
Langmuir, vol.33(5), p.1256-1264, 2017
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04235>
- AI15 *Osmotic pressures of lysozyme solutions from gas-like to crystal state*
C. Pasquier, S. Beaufils, **A. Bouchoux**, S. Rigault, B. Cabane, M. Lund, V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, M. Pasco, G. Paboeuf, J. Pérez, S. Pezennec*
Physical Chemistry Chemical Physics, vol.18(41), p.28458-28465, 2016
<http://dx.doi.org/10.1039/c6cp03867k>
- AI14 *Diffusion and partitioning of macromolecules in casein microgels: evidence for size-dependent attractive interactions in a dense protein system*
P. De Sa Peixoto*, **A. Bouchoux***, S. Huet, M.-N. Madec, D. Thomas, J. Floury, G. Gésan-Guizieu*
Langmuir, vol.31(5), p.1755-1765, 2015
<http://dx.doi.org/10.1021/la503657u>

^aLes astérisques signalent le ou les auteurs correspondants

- AI13 *Structural heterogeneity of milk casein micelles: a SANS contrast variation study*
A. Bouchoux*, J. Ventureira, G. Gésan-Guiziou, F. Garnier-Lambrouin, P. Qu, C. Pasquier, S. Pezennec, R. Schweins, B. Cabane
Soft Matter, vol.11, p.389-399, 2015
<http://dx.doi.org/10.1039/c4sm01705f>
[correction : <http://dx.doi.org/10.1039/C4SM90166E>]
- AI12 *On the cohesive properties of casein micelles in dense systems*
P. Qu, **A. Bouchoux***, G. Gésan-Guiziou
Food Hydrocolloids, vol.43, p.753-762, 2015
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.005>
- AI11 *A general approach for predicting the filtration of soft and permeable colloids: the Milk example*
A. Bouchoux*, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou, Langmuir, vol.30(1), p.22-34, 2014
<http://dx.doi.org/10.1021/la402865p>
- AI10 *Molecular mobility in dense protein systems: an investigation through ¹H NMR relaxometry and diffusometry*
A. Bouchoux*, D. Schorr, A. Daffé, M. Cambert, G. Gésan-Guiziou, F. Mariette
Journal of Physical Chemistry B, vol.116, p.11744-11753, 2012
<http://dx.doi.org/10.1021/jp306078k>
- AI9 *Dead-end filtration of sponge-like colloids: the case of casein micelle*
P. Qu, G. Gésan-Guiziou*, **A. Bouchoux***
Journal of Membrane Science, vols.417-418, p.10-19, 2012
<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2012.06.003>
- AI8 *AFM imaging of milk casein micelles: evidence for structural rearrangement upon acidification*
M. Ouanezar, F. Guyomarc'h*, **A. Bouchoux***
Langmuir, vol.28(11), p.4915-4919, 2012
<http://dx.doi.org/10.1021/la3001448>
- AI7 *Contribution of surface β -glucan polysaccharide to physicochemical and immunomodulatory properties of *Propionibacterium freudenreichii**
S.-M. Deutsch*, S. Parayre, **A. Bouchoux**, F. Guyomarc'h, J. Dewulf, M. Dols-Lafargue, F. Baglinière, F. Cousin, H. Falentin, G. Jan, B. Foligné
Applied and Environmental Microbiology, vol.78(6), p.1765-1775, 2012
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07027-11>

- AI6 *Ionic strength dependence of skimmed milk microfiltration: relations between filtration performance, deposit layer characteristics and colloidal properties of casein micelles*
A.J.E. Jimenez-Lopez*, N. Leconte, F. Garnier-Lambrouin, **A. Bouchoux**, F. Rousseau, G. Gésan-Guiziou*
Journal of Membrane Science, vol.369(1-2), p.404-413, 2011
<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2010.12.026>
- AI5 *How to squeeze a sponge: casein micelles under osmotic stress, a SAXS study*
A. Bouchoux*, G. Gésan-Guiziou, J. Pérez, B. Cabane*
Biophysical Journal, vol.99(11), p.3754-3762, 2010
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.019>
- AI4 *Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions*
A. Bouchoux*, B. Debou, G. Gésan-Guiziou, M.-H. Famelart, J.-L. Doublier, B. Cabane
Journal of Chemical Physics, vol.131(16), p.165106, 2009
<http://dx.doi.org/10.1063/1.3245956>
- AI3 *Casein micelles dispersions under osmotic stress*
A. Bouchoux*, P.-E. Cayemitte, J. Jardin, G. Gésan-Guiziou, B. Cabane
Biophysical Journal, vol.96(2), p.693-706, 2009
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.006>
[correction : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.02.006>]
- AI2 *Investigation of nanofiltration as a purification step for lactic acid production processes based on conventional and bipolar electrodialysis operations*
A. Bouchoux*, H. Roux-de Balman, F. Lutin
Separation and Purification Technology, vol.52(2), p.266-273, 2006
<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2006.05.011>
- AI1 *Nanofiltration of glucose and sodium lactate solutions: variations of retention between single- and mixed-solute solutions*
A. Bouchoux*, H. Roux-de Balman, F. Lutin
Journal of Membrane Science, vol.258(1-2), p.123-132, 2005
<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2005.03.002>

Articles publiés dans des revues nationales à comité de lecture (AN)

- AN3 *Modeling the filtration of soft and permeable colloids: the milk case study*
A. Bouchoux*, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou
Récents Progrès en Génie des Procédés, vol.104-2013, 2013
- AN2 *Impact de la force ionique en filtration de lait : analyse des caractéristiques des micelles de caséines et des dépôts*
G. Gésan-Guiziou*, **A. Bouchoux**, A. Jimenez-Lopez, F. Garnier-Lambrouin
Récents Progrès en Génie des Procédés, vol.98-2009, 2009

AN1 *Evaluation de la nanofiltration pour son intégration dans un procédé de production d'acides organiques reposant sur une étape d'électrodialyse à membranes bipolaires*

A. Bouchoux*, H. Roux-de Balman, F. Lutin

Récents Progrès en Génie des Procédés, vol.89-2003, p.75-82, 2003

Article soumis

AS1 *Proteins for the future: a soft matter approach to link basic knowledge and innovative applications*

A. Boire, **A. Bouchoux**, S. Bouhallab, A.-L. Chapeau, T. Croguennec, V. Ferraro, V. Lechevalier, P. Menut, S. Pézenec, D. Renard, V. Santé-Lhoutellier, K. Laleg, V. Micard, A. Riaublanc, M. Anton*

Soumis à Innovative Food Science and Emerging Technologies, fév.2017

Articles en préparation

AP1 *Microgel packings under pressure: Microscale structure and compressive resistance*

I. Bouhid de Aguiar, K. Schroën, M. Meireles*, **A. Bouchoux***

Soumission probable à Colloids and Surfaces A

AP2 *Soft matter approaches to food proteins*

A. Boire*, **A. Bouchoux**, S. Bouhallab, T. Croguennec, V. Lechevalier, P. Menut*, S. Pézenec, D. Renard

Soumission probable à Annual Review of Food Science and Technology

AP3 *Asymmetric binding of Na⁺ and Cl⁻ with charged groups of ovalbumin and lysozyme modulates their associative properties at the air-water interface*

C. Pasquier, L.-T. Lee, B. Cabane, **A. Bouchoux**, V. Lechevalier, M. Pasco, S. Pezenec*, S. Beauvils*

AP4 *Osmotic pressure and structure of ovalbumin solutions*

C. Pasquier, S. Beauvils, **A. Bouchoux**, S. Rigault, B. Cabane, M. Lund, V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, M. Pasco, G. Paboeuf, J. Pérez, S. Pezenec*

AP5 *A tailored and non-altering enzyme immobilization approach to explore plant biomass deconstruction*

C. Montanier*, **A. Bouchoux**

Soumission probable à Biomacromolecules

1.3 Encadrement

Codirection de thèses

Je suis à l'origine des sujets des deux thèses que je codirige actuellement et de celle que j'ai codirigée au STLO. Je suis ou étais dans tous les cas l'interlocuteur principal du doctorant sur les aspects scientifiques.

Lucie Dianteill, sept. 2016 - sept. 2019 (en cours)

Cinétiques enzymatiques aux interfaces et en milieu confiné : cas de la biomasse lignocellulosique

Thèse de doctorat de l'INSA Toulouse

Financement : INRA/CEPIA, Région Midi-Pyrénées/Occitanie, équipe TIM

Responsabilité : codirection avec Claire Dumon (LISBP)

Travaux associés : séminaire S31, poster P21^b

Ce projet vise à caractériser l'action d'enzymes lignocellulolytiques dans des situations modèles de confinement ou d'interface. Les moyens mis en œuvre sont principalement ceux de la physico-chimie et de la physique de la matière molle, avec une caractérisation des processus et des structures aux petites échelles (du nm au micron). Ces travaux se fondent en partie sur les résultats des stages de Master de Lucie Dianteill et Amal Zeidi. Ils bénéficient d'un soutien de l'INRA et de la région Occitanie pour le salaire de Lucie, et d'un soutien direct de mon équipe d'accueil au LISBP pour les frais de fonctionnement. Cette thèse est un appui essentiel à mes projets et perspectives de recherche au LISBP (partie 3).

Izabella Bouhid De Aguiar, nov. 2013 - oct. 2017 (en cours)

Filtration and compression of deformable and porous microparticles

Thèse de doctorat en cotutelle entre l'UPS, UTwente (Pays-Bas) et WUR (Pays-Bas)

Financement: Union européenne via le programme EUDIME

Responsabilité : codirection avec M. Meireles (LGC)

Travaux associés : article en préparation AP1, communication C26, posters P23 et P22, séminaires S27 et S26

Ce projet a pour origine le travail de stage de Florian Lange que j'ai encadré avec M. Meireles lors de mon accueil au LGC et qui consistait à suivre l'accumulation de microgels à la surface d'une membrane. L'idée plus générale du travail d'Izabella est de caractériser la structure et la résistance à la compression de suspensions concentrées de microgels. Les microgels sont des objets modèles qui ont la propriété d'être à la fois déformables et poreux, ce qui correspond à de nombreux objets que l'on retrouve dans l'industrie dont la micelle de caséine par exemple. En étudiant les microgels, l'objectif est d'aller au-delà de la problématique spécifique de la filtration du lait et de tenter de décrire le comportement générique de tels objets lorsqu'ils sont soumis à des opérations de concentration de type filtration, évaporation ou séchage (partie 2.4.3). Le financement de la thèse d'Izabella est assuré par l'Union européenne dans le cadre d'un programme dédié aux procédés de filtration membranaire. En plus de son accueil dans un laboratoire hôte (le LGC Toulouse en l'occurrence) et comme le demande l'Europe pour ce programme, Izabella a effectué deux mobilités de 6 mois dans des universités européennes, UTwente et WUR en l'occurrence. A WUR, Izabella a

^bLes communications, séminaires et posters sont listés en annexe B

travaillé avec Karin Schröen et Joris Sprakel, deux chercheurs qui ont récemment développé des approches expérimentales inédites pour la visualisation du comportement de particules en compression par centrifugation et filtration. Pour des raisons de montage administratif, il est convenu qu'Izabella soutienne sa thèse à WUR selon les modalités de cette université. La soutenance aura lieu en septembre-octobre 2017.

Peng Qu, oct. 2009 - oct. 2012

Filtration de dispersions de micelles de caséine : propriétés du dépôt, interactions colloïdales et modélisation

Thèse de doctorat de l'AGROCAMPUS-OUEST

Financement : INRA/CEPIA et Région Bretagne

Responsabilité : codirection avec G. Gésan-Guizieu (STLO)

Travaux associés : articles AI13, AI12, AI11, AI9, AN3, communications C27, C23, C22, C20, C16, posters P18, P15, P13, séminaires S25 et S20

Il s'agit de ma première thèse en codirection. L'objectif du travail de Peng était de faire le lien entre la filtration membranaire d'un lait et les propriétés de structure et d'interaction de suspensions concentrées de micelles de caséines telles que je les caractérisais par ailleurs avec des collègues et stagiaires. Peng a essentiellement travaillé sur l'aspect génie des procédés de mon projet au STLO (partie 2.2), avec des publications qui portent majoritairement sur la description et la modélisation de la filtration. Il a également participé à de premiers travaux visant à caractériser la nature des forces d'adhésion entre micelles de caséine quand on les force au contact. L'association Bretagne biotechnologie alimentaire (BBA) qui regroupe l'ensemble des organismes de recherches et des professionnels laitiers du grand ouest (Lactalis, Bel, Danone,...) a participé au comité de thèse de Peng. Un des objectifs du travail était en effet de parvenir à tirer de premières recommandations pour la conduite optimale de la filtration d'un lait écrémé (article AI11). Il nous semblait important de partager ces informations avec les industriels de façon à les convaincre que les approches nouvellement développées au STLO étaient pertinentes. BBA a ensuite participé au financement du postdoctorat de Paulo De Sa Peixoto (cf page suivante). Peng a été embauché en décembre 2014 par le groupe Yili en Chine, industriel laitier et acteur majeur de l'agroalimentaire dans ce pays. Il y travaille en tant qu'ingénieur recherche et développement en poste à Pékin actuellement.

Participation à des thèses de façon non-formalisée

J'ai participé au STLO aux travaux de deux doctorantes, à des degrés divers d'implication.

Coralie Pasquier, 2011-2014

Adsorption aux interfaces et compression osmotique : deux voies de confinement des protéines en phase aqueuse

Thèse de doctorat de l'université de Rennes 1 (physique)

Travaux associés : article AI15, articles en préparation AP3 et AP4, communication C25, posters P20 et P17, séminaires S29, S28 et S24

Cette thèse était encadrée par Stéphane Pézenec du STLO et Sylvie Beauflis, professeur à l'IPR. A mon arrivée au STLO, une problématique qui animait ces chercheurs était le comportement des protéines globulaires à l'interface eau-air en termes d'interactions et de structuration, avec des

applications dans le domaine des mousses alimentaires par exemple. A mesure que je développais mes activités de recherche sur la micelle de caséine aux fortes concentrations, S. Pézenec et moi-même avons peu à peu discuté du lien potentiel entre interactions protéines-protéines aux interfaces et interactions protéine-protéines en *bulk*, cad mesurées en solution à travers la pression osmotique par exemple (partie 2.4.2). Ces discussions se sont concrétisées par le co-encadrement d'une stagiaire en 2010 (Sophie Rigault) sur un projet visant à mesurer la pression osmotique de solutions de protéines dont le comportement à l'interface eau-air était étudié par ailleurs. La thèse de Coralie reposait directement sur ce travail, avec un programme comprenant des mesures de pression osmotique plus exhaustives et une caractérisation de la structure des solutions concentrées et des interfaces par diffusion de rayonnement et réflectivité. Sans être fortement impliqué dans l'encadrement de Coralie, j'ai suivi son travail tout au long de sa thèse et y ai participé de façon très régulière. Mon soutien a été d'ordre expérimental avec le suivi des expériences de stress osmotique, la co-rédaction d'un *proposal* SAXS et la participation aux expériences de SAXS et réflectivité de neutron réalisées lors de la thèse. J'ai également participé de façon significative à l'analyse, l'interprétation des résultats et à la rédaction du premier article issu de ces travaux (AI15). Deux autres publications auxquelles je suis associé sont actuellement en cours de rédaction.

Anne Jimenez-Lopez, 2004-2007

Structuration du dépôt de matière à la membrane lors de la microfiltration tangentielle (0,1 μ m) de lait écrémé

Thèse de doctorat de l'AGROCAMPUS-OUEST

Travaux associés : article AI6 et AN2, communication C14 et C13, poster P7

Cette thèse, dirigée par Geneviève Gésan-Guiziou, a démarré un peu plus d'un an avant mon arrivée au STLO. Le travail consistait à déterminer les principaux paramètres responsables des phénomènes de colmatage lors de la microfiltration d'un lait. L'approche suivie relevait du génie chimique classique et reposait sur des expériences de filtration réalisées sur les installations pilote du laboratoire. Je n'ai pas été associé à cette thèse de prime abord et je n'ai pas participé à l'encadrement d'Anne. J'ai par contre été associé à la réflexion autour des derniers résultats de la thèse concernant l'effet de la force ionique sur les performances de la filtration. Il s'avérait en effet que les phénomènes que j'avais mis en évidence sur des dispersions concentrées de micelles de caséines pouvaient aider à comprendre les résultats d'Anne. J'ai de ce fait participé activement à la rédaction de l'article présentant ces effets de force ionique (AI6).

Supervision de séjours postdoctoraux

Paulo De Sa Peixoto, juin 2011 - juin 2013

Diffusion de traceurs moléculaires dans des dispersions concentrées de micelles de caséine

Financement : INRA/CEPIA et BBA

Responsabilité : co-supervision avec G. Gésan-Guiziou (STLO)

Travaux associés : articles AI16 et AI14, communication C21, poster P19, séminaire S23

Ce projet visait à prolonger mes activités au STLO concernant les dispersions denses de micelles de caséine. Il s'agissait de caractériser les propriétés diffusionnelles de ces systèmes, par FRAP notamment, en vue de mieux comprendre les mécanismes de sélectivité observés en filtration. Au cours de son passage au STLO, Paulo a également pris l'initiative de réaliser des expériences de RMN

du solide sur des dispersions denses de micelles de caséine. L'objectif était cette fois de caractériser les interactions entre phosphate de calcium et caséines au sein de la micelle dans des conditions de fort confinement spatial. En raison de mon départ pour Toulouse, je n'ai côtoyé Paulo que les premiers mois de son postdoc à Rennes. Je me suis par contre pleinement impliqué dans le suivi des travaux de ce jeune chercheur par des déplacements réguliers au STLO, des visioconférences, et un suivi assidu par mails. Après ce postdoc, Paulo a continué de travailler au STLO avec différents collègues (Said Bouhallab et Fanny Guyomarc'h). Admis au concours CR2 INRA de l'année 2015, il travaille actuellement au laboratoire UMET de Lille sur des problématiques d'adhésion et de structuration de dépôts protéines-minéraux dans les installations agroalimentaires.

Encadrement de stages Master et ingénieur

Thomas Cummings, 2017 (5 semaines)

Synthèse et dégradation enzymatique de colloïdes lignocellulosiques

Stage de Master of pharmaceutical bioprocess engineering de l'université technologique de Munich

Responsabilité : 30%, co-encadrement avec Lucie Dianteill (doctorante LISBP)

Lucie Dianteill, 2015 (6 mois)

Suivi in-situ de la dégradation enzymatique de films modèles d'hémicellulose

Stage de Master 2 professionnel bioingénierie biotechnologies végétales, UPS

Responsabilité : 100%

Après ce stage, Lucie a été embauchée sur les fonds propres de l'équipe TIM pour continuer ses travaux sur une période de 10 mois. Elle est actuellement en thèse sous ma codirection (cf plus-haut).

Amal Zeidi, 2014 (5 mois)

Suivi in-situ de la dégradation enzymatique de films modèles d'hémicellulose

Stage de 5^{ème} année de l'Institut national des sciences appliquées et de technologie de Tunis

Responsabilité : 100%

Travaux associés : poster P21

Florian Lange, 2012 (4 mois)

Filtration sur micro-séparateurs de particules poreuses et déformables

Stage de 1^{ère} année d'école d'ingénieur ENSIC (alternance)

Responsabilité : 70%, co-encadrement avec M. Meireles (LGC)

Travaux associés : communication C26, séminaire S26

Wenjiao Shao, 2011 (6 mois)

Caractérisation des forces cohésives mises en jeu entre micelles de caséines en milieu concentré

Stage de Master 2 professionnel alimentation, lait, innovation, management, AGROCAMPUS-OUEST

Responsabilité : 33%, co-encadrement avec G. Gésan-Guizieu (STLO) et P. Qu (doctorant STLO)

Mustapha Ouanezar, 2011 (6 mois)

Etude de la micelle de caséine par microscopie à force atomique

Stage de Master biotechnologies, agro-alimentaire, nutrition, Université Henri Poincaré, Nancy
 Responsabilité : 50%, co-encadrement avec F. Guyomarc'h (STLO)
 Travaux associés : article AI8, communication C18, posters P16 et P14

Sophie Rigault, 2010-2011 (6 mois)

Compression osmotique de protéines globulaires

Stage assistant ingénieur de l'Université de technologie de Compiègne

Responsabilité : 30%, co-encadrement avec S. Pézenec (STLO)

Travaux associés : article AI15, article en préparation AP4, communication C25 et C17, poster P17

Diane Schorr, 2010 (10 mois)

Etude de la diffusion de l'eau dans les gels laitiers par la technique de RMN

Stage de Master 2 professionnel de chimie, Université de Nantes

Responsabilité : 33%, co-encadrement avec G. Gésan-Guizieu (STLO) et F. Mariette (IRSTEA Rennes)

Travaux associés : article AI10, communication C15, poster P12

Quingqing Wang, 2009-2010 (6 mois)

Etablissement de l'équation d'état de dispersions de micelles de caséine

Stage assistant ingénieur de l'Université de technologie de Compiègne

Responsabilité : 33%, co-encadrement avec G. Gésan-Guizieu (STLO) et P. Qu (doctorant STLO)

Peng Qu, 2009 (6 mois)

Filtration membranaire de dispersions modèles de micelles de caséine : relation entre pression osmotique et performance de filtration

Stage de Master 2 professionnel de sciences et technologie des aliments, AGROCAMPUS-OUEST

Responsabilité : 70%, co-encadrement avec G. Gésan-Guizieu (STLO)

Awa Daffé, 2009 (6 mois)

Etude de la microstructure des dispersions denses de micelles de caséines : mesures de diffusion par RMN

Stage de Master 2 professionnel de chimie, Université de Nantes

Responsabilité : 33%, co-encadrement avec G. Gésan-Guizieu (STLO) et F. Mariette (IRSTEA Rennes)

Travaux associés : article AI10

Belkacem Debbou, 2008 (6 mois)

Comportement rhéologique de dispersions denses de micelles de caséine natives

Stage de Master 2 recherche de biologie, Université de Rennes 1 / AGROCAMPUS-OUEST

Responsabilité : 100%

Travaux associés : article AI4, communication C12, posters P11 et P10, séminaires S11 et S10

Pierre-Emerson Cayemitte, 2008 (6 mois)

Détermination des forces d'interactions entre micelles de caséine en solutions concentrées : mesures par compression osmotique

Stage de Master 2 professionnel de sciences et technologie des aliments, AGROCAMPUS-OUEST

Responsabilité : 100%

Travaux associés : article AI3, communication C10, posters P11 et P9, séminaires S11, S10 et S8

Sylvain Cloteau, 2007 (3 mois)

La micelle de caséine : caractérisation par AFM

Stage technique de l'IUT de Nantes

Responsabilité : 50%, co-encadrement avec E. Balnois (Université de Bretagne Sud, Lorient)

Ces travaux ont été menés pour l'essentiel au laboratoire L2PIC de Lorient (Laboratoire polymères, propriétés aux interfaces et composites), aujourd'hui partie prenante de l'Institut de recherche Dupuy de Lôme.

Abderrahim Haroun, 2006 (6 mois)

Caractérisation de dépôts obtenus en filtration frontale d'un lait écrémé

Stage de Master 2 recherche de biologie, Université de Rennes 1 / AGROCAMPUS-OUEST

Responsabilité : 50%, co-encadrement avec G. Gésan-Guizieu (STLO)

Travaux associés : communication C9

1.4 Implication dans des programmes de recherche financés

Je ne reviens pas ici sur les projets de thèses et de postdoc que j'ai codirigés ou que je codirige actuellement (cf partie 1.3,) et qui ont été financés en grande partie via des appels d'offres INRA et/ou INRA-Région.

Programme de l'ANR : projet ECOPROM 2007-2010

Le projet ECOPROM (écoconception de procédés à membranes visant l'obtention de protéines à fonction(s)), porté par Geneviève Gésan-Guiziou du STLO, a été financé de 2007-2010. Il avait pour objectif principal d'étudier les performances des opérations membranaires pour la production de fractions protéiques purifiées d' α -lactalbumine et β -lactoglobuline à partir d'un lait. Un aspect essentiel du projet était également d'adopter une démarche d'écoconception pour, à partir des résultats de la recherche, proposer des procédés plus respectueux de l'environnement. J'ai participé à la rédaction de certaines parties de ce projet avant sa soumission à l'ANR. Après son acceptation, il était ensuite prévu que je participe au développement de modèles de filtration spécifiques des protéines étudiées, en collaboration avec une doctorante du STLO (Marieke Van Audenhege) et des chercheurs de l'université de Rennes (dont Murielle Rabiller-Baudry). Mais je n'ai finalement pas été impliqué dans ces travaux. Accessoirement, j'ai été le responsable du site internet du projet de 2007 à 2010 et conférencier invité lors d'une journée organisée dans le cadre d'ECOPROM (séminaire S10).

Financements INRA : actions nouvelles soutenues

Outre les thèses de Peng Qu et Lucie Dianteill et le postdoc de Paulo De Sa Peixoto, mes travaux ont bénéficié d'un soutien financier de l'INRA à travers le programme d'actions nouvelles soutenues (ANS) du département CEPIA. Ce programme vise à accompagner des projets nouveaux et/ou considérés comme risqués par les financeurs habituels. J'ai participé à 4 ANS, 3 en tant que porteur principal et une en tant que co-responsable :

- 2007-2008 : Evaluation des forces d'interactions intermicellaires par compression osmotique. En tant que porteur principal. Financement INRA de 2 x 7500€.
- 2009-2010 : Etude de la microstructure de dispersions concentrées et de gels de micelles de caséines : mesures de diffusion par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). En tant que participant actif (G. Gésan-Guiziou était le porteur principal). 2 x 15000€.
- 2010-2011 : Interactions à courte distance et phénomènes d'adhésion entre micelles de caséine : que peut-on apprendre de mesures de force ? En tant que porteur principal avec F. Guyomarc'h (STLO). 2 x 15000€.
- 2014-2015 : Suivi in-situ de la dégradation enzymatique de films modèles d'hémicellulose par QCM-D. En tant que porteur principal. 2 x 15000€.

Proposals sur grands instruments

Ces projets sont financés par les organismes où les expériences sont réalisées (synchrotrons, réacteur nucléaire de recherche) après un processus d'évaluation des propositions qui leur sont faites. Il s'agit de projets de petite envergure mais il me semblait quand-même intéressant de les donner ici.

- 2016, *proposal* ILL n°9-13-664 : Interactions of alpha-synuclein with lipid vesicles. Le responsable de ce projet était Bernard Cabane, en collaboration avec des collègues de l'université de Lund dont Emma Sparr notamment. 72 heures ont été allouées sur la ligne D11 pour des expériences SANS en variation de contraste.

- 2013, *proposal* LLB n°1149672 : Modalités d'adsorption de protéines globulaires à l'interface air—solution. Responsable principal : Stéphane Pézennec, STLO. 96 heures allouées sur le spectromètre HERMES pour des expériences de réflectivité de neutrons.
- 2011, *proposal* Soleil n°20110380 : Protein interactions and self-assembly in highly crowded conditions. Co-responsable avec Stéphane Pezennec, STLO. 48 heures allouées sur la ligne SWING, SAXS.
- 2010, *proposal* ILL n°9-13-342 : Structure of casein micelles. Co-responsable avec Bernard Cabane, ESPCI. 72 heures allouées sur la ligne D11, SANS.
- . 2008, *proposal* Soleil n°20080305 : Understanding the phase behaviour of concentrated casein micelles suspensions: the role of inter- and intra-micellar interaction forces. Responsable principal. 24 heures allouées sur la ligne SWING, SAXS.

1.5 Animation de la recherche, responsabilités collectives

Dans les laboratoires

Depuis 2017. Séminaire du LISBP. Depuis le 1er janvier 2017, Stéphanie Heux (CR INRA) et moi-même sommes responsables de l'organisation des séminaires internes du LISBP. Ces séminaires existent depuis 2015, la direction souhaitant alors relancer une animation scientifique large et ouverte à l'ensemble du laboratoire. Les séminaires ont lieu une semaine sur deux le jeudi en début d'après-midi et sont donc ouverts à tous les personnels du LISBP, soit environ 320 personnes. Proposer des séminaires réguliers à un collectif aussi important n'est pas une tâche facile, d'autant que le LISBP est un laboratoire multidisciplinaire qui rassemble des personnes d'horizons variés et très spécialisés : du métabolisme des cellules eucaryotes à la mécanique des fluides par exemple. Sur la période 2015-2016, la fréquentation des séminaires a d'ailleurs très nettement baissé, avec une ségrégation progressive des publics en fonction des intérêts de chacun. Pour 2017, notre objectif avec Stéphanie Heux est de mobiliser à nouveau l'ensemble du laboratoire autour de ces séminaires. Pour ce faire, notre idée est d'alterner séminaire d'équipe et séminaire d'un intervenant extérieur. Les séminaires d'équipe sont l'occasion d'informer l'ensemble du laboratoire des travaux de chacun, du démarrage d'un projet important, ou de l'existence d'une technique expérimentale ou de simulation susceptible d'intéresser le plus grand nombre, par exemple. Les séminaires extérieurs sont eux donnés par des intervenants chercheurs ou industriels extérieurs au LISBP (national, international). Là, tous les sujets en lien avec les thématiques du laboratoire peuvent être abordés et nous proposons de ne pas nous limiter aux approches de sciences *exactes*, mais aussi pourquoi pas de nous ouvrir aux sciences humaines : éthique, sociologie, philosophie, histoire, économie. Dans tous les cas, nous demandons aux intervenants de faire un effort particulier pour que leur présentation soit simple et accessible. Depuis sa mise en place, cette nouvelle formule n'a pas vraiment permis de regagner autant de public que nous le souhaitions, mais il est certainement encore un peu tôt pour juger de sa réelle pertinence.

Depuis 2015. Club lignocellulose au LISBP. Les activités de recherche concernant la dégradation et la valorisation de la biomasse lignocellulosique sont nombreuses au LISBP. La thématique est de plus clairement transverse et inter-équipes, avec des approches variées relevant de la microbiologie, de l'ingénierie enzymatique, du génie des procédés, et des technologies *omiques* pour la découverte de nouvelles enzymes. En février 2015, Cédric Montanier (CR INRA), Guillermina Hernandez-Raquet (DR INRA), et moi-même avons pris l'initiative de créer un *club lignocellulose*. L'objectif était de disposer au LISBP d'une structure pérenne visant à promouvoir les échanges et discussions entre les chercheurs impliqués dans une problématique relevant de la lignocellulose. Les objectifs du club sont divers : lieu d'échanges et de convivialité, émulation/stimulation scientifique, outil d'analyse des forces et faiblesses du laboratoire sur le thème, moyen d'accroître la visibilité du groupe en interne et à l'extérieur, préparation de documents communs d'information et de communication. Le club s'est réuni un peu plus d'une dizaine de fois depuis 2015. A ses débuts, il rassemblait un nombre important de scientifiques du laboratoire. Les premières réunions ont permis à chacun de présenter ses recherches et de dresser ainsi une cartographie complète des activités lignocellulose au LISBP. Les réunions suivantes, généralement organisées autour d'une présentation d'un doctorant ou postdoctorant autour de questions plus spécifiques, ont eu moins de succès. Mais là encore, une

telle animation relève d'un travail de longue haleine et nous continuons de faire vivre le club en tentant d'assurer des réunions régulières et qui intéressent le plus grand nombre.

2009-2011. Responsable de la microscopie à force atomique au STLO. Courant 2009, la direction du STLO m'a demandé de m'occuper de l'achat d'un AFM pour le laboratoire : montage des dossiers de subvention, appel d'offre, arbitrage. L'AFM retenu, d'une valeur d'environ 220 k€, a été réceptionné en novembre 2009. Il s'agissait alors d'un instrument de dernière génération, spécialement conçu pour la manipulation d'objets biologiques, couplé avec un microscope optique inversé et offrant la possibilité de travailler en milieu liquide. J'ai été le responsable principal de cet appareil de novembre 2009 jusqu'à mon départ à Toulouse en octobre 2011. J'ai demandé à Gwenaél Jan (DR INRA) et Fanny Guyomarc'h (IR INRA) de me seconder dans cette tâche sur les applications microbiologie et biochimie, respectivement. Dans un premier temps, mon rôle a consisté à faire connaître la technique AFM de mes collègues du STLO afin de susciter leur intérêt et d'engager différentes actions de recherches : de l'obtention rapide d'images d'appoint à l'élaboration de projets centrés sur l'utilisation de l'AFM. Au cours de cette période, F. Guyomarc'h et moi-même avons réalisé différents travaux concernant la micelle de caséine (stage Mustapha Ouanezar, article A18) et les propriétés de surface de bactéries probiotiques (article A17). A mon départ de Rennes, Fanny Guyomarc'h est devenue la responsable principale de l'appareillage AFM au STLO. La technique est à présent utilisée de façon régulière par les chercheurs du STLO.

Au niveau local et régional

Depuis 2011. Fédération de recherche FERMaT. La fédération de recherche FERMaT (fluides, énergie, réacteurs, matériaux et transferts, fédération CNRS n°3089) est une entité toulousaine structurée autour de 6 laboratoires principaux : le LGC, l'IMFT, le CIRIMAT, le LAPLACE, le LAAS et le LISBP. La fédération a pour objectif central d'initier et de soutenir des projets de recherche interdisciplinaires dans le domaine des sciences pour l'ingénieur sur Toulouse et sa région. Ce soutien se concrétise par l'achat d'équipements lourds mis à disposition des laboratoires FERMaT et de leurs partenaires universitaires ou industriels. FERMaT finance également un contrat postdoctoral chaque année sur des projets inter-laboratoires. FERMaT est organisé autour de 5 thèmes de recherche auxquels peuvent participer les chercheurs de tous les laboratoires impliqués. Des réunions de thème sont organisées régulièrement (1-2 par an) pour confronter les idées et approches de chacun et discuter des projets communs en cours et à venir. Depuis 2011, je participe à deux thèmes de recherche : (1) Milieux poreux et colloïdes, dans lequel apparaît la thèse d'I. Bouhid de Aguiar, codirigée avec Martine Meireles du LGC, (2) Ingénierie du vivant, dans le cadre de mes recherches sur la biomasse lignocellulosique mais sans véritable projet labellisé FERMaT pour l'instant. Je suis également responsable du thème milieux poreux et colloïdes depuis janvier 2017. Cette responsabilité consiste à animer le thème par des réunions régulières (au moins deux par an) généralement construites autour de l'intervention d'un chercheur sur une problématique particulière. Les réunions de thème sont aussi l'occasion pour les membres de faire remonter et de discuter leurs demandes d'instrumentation et de financement de postdoc. Le responsable de thème a en charge de classer ces demandes et de les proposer au conseil de la fédération qui se regroupe également deux fois par an. L'arbitrage final est réalisé au cours de ce conseil qui rassemble les responsables de thème et les représentants de chaque laboratoire. Dans le cadre du CPER 2015-

2020, la fédération FERMaT a obtenu une somme d'argent qui a permis l'acquisition d'un instrument SAXS installé sur le campus de l'UPS fin 2016. L'accès à cet instrument se fait après soumission et acceptation d'une proposition d'expériences. En tant que responsable de thème, je suis amené à participer à l'examen de ces propositions.

Au niveau national

Depuis 2006. GdR AMC2, approches multi-physiques pour les systèmes colloïdaux concentrés. Ce GDR, initialement intitulé "Structuration, consolidation et drainage de colloïdes" existe depuis 2006 et a été renouvelé pour 4 ans en 2010 puis 2014. Il est dirigé par Martine Meireles (LGC, Toulouse) et regroupe, dans sa configuration actuelle, des chercheurs de près de 20 laboratoires différents dont 4 laboratoires INRA. L'objectif du GDR est de promouvoir les échanges et les collaborations autour des questions relatives au comportement des objets colloïdaux (protéines, polymères, particules) et à leurs interactions dans les processus de concentration (compression, séchage, filtration) ou de redispersion. Ces échanges ont lieu lors d'un séminaire annuel organisé sur 2 jours et auquel est adossé certaines années un workshop ouvert à l'international sur une question en particulier (nanocomposites polymères, processus de séchage par ex.). Je suis membre de ce GDR depuis 2008, et conférencier/co-conférencier lors des séminaires organisés depuis cette date (séminaires S31, S29, S28, S27, S26, S25, S24, S23, S20, S19, S18, S17, S11, S9 et S8 en annexe B). La plupart des travaux présentés relèvent de mes activités au STLO et du comportement de la micelle de caséine ou des protéines globulaires aux fortes concentrations. Mais les approches de physico-chimie que je développe au LISBP pour suivre l'action d'enzymes lignocellulolytiques ont également toute leur place et cohérence dans ce GDR. C'est la raison pour laquelle je continue d'y être pleinement engagé.

Depuis 2017. Projet de GdR SLAMM, structurer la matière molle. Le GdR AMC2 arrive à son terme fin 2017. Cependant, les équipes impliquées ont clairement l'intention de continuer à travailler ensemble et de renouveler l'expérience d'un GdR sur la période 2018-2021. Je suis directement impliqué dans cette initiative car je suis le coordinateur INRA du projet de GdR SLAMM porté côté CNRS par Laurence Ramos (L2C, Montpellier) et Ludovic Pauchard (FAST, Orsay). Mes collègues et moi-même sommes en train de préparer le dossier de création de ce GdR pour une soumission à l'institut de chimie du CNRS à l'été 2017. Le département CEPIA de l'INRA a d'ores et déjà donné son accord pour un soutien financier de l'ordre de 7500€ par an si le GdR est accepté par le CNRS. Avec le projet SLAMM, l'objectif est de fédérer des chercheurs autour de l'approche scientifique déjà revendiquée dans le GdR AMC2 et qui consiste (i) à caractériser, aux échelles intermédiaires (du nanomètre au micron), les structures et interactions au sein d'un système d'intérêt, (ii) à établir les liens entre ces propriétés et le comportement du système à l'équilibre ou au cours d'un processus de transformation. Notre idée est de couvrir une plus grande étendue de thématiques et d'objets d'étude que le GdR AMC2. Il s'agit notamment de ne plus limiter le GdR aux systèmes colloïdaux concentrés mais de l'élargir aux systèmes colloïdaux en général, incluant les solutions de polymères et les protéines, et aux problématiques rencontrées aux interfaces, dans les émulsions et dans des gels. L'objectif est également d'accorder une part encore plus importante aux activités de l'INRA, avec une ouverture vers les problématiques de dégradation enzymatique et de diffusion et transport de petites espèces dans des structures diverses : matrices fromagères et paroi lignocellulosique par exemple. Les actions que nous prévoyons sont proches de celles déjà mises en place dans AMC2,

avec un séminaire annuel et l'organisation connexe de workshops ou écoles chercheur.

Contributions diverses

- Je suis rapporteur pour des revues internationales dont Journal of Membrane Science, Separation & Purification Technology, Langmuir, Food Hydrocolloids, Pharmaceutical Research, Soft Matter, International Dairy Journal.
- J'ai participé à la rédaction d'un certain nombre de documents INRA (pages web, rapport, plaquettes) à destination du grand public et/ou d'un public plus spécialisé. Ces documents sont listés en annexe B.
- Enfin j'ai participé et je participe encore à un total de six comités de thèse, dont actuellement les thèses de Haiyang Wu, dirigée par Claire Dumon (LISBP), Louise Badruna, dirigée par Cédric Montanier (LISBP), et Floriane Doudiès, dirigée par Genéviève Gésan-Guizieu (STLO).

2 Activités de recherche

Procédés de filtration, micelle de caséine... et matière molle

2.1 Mécanismes de sélectivité de membranes synthétiques et biologiques

Nanofiltration de solutions d'acides organiques et de sucres

Articles AI1 et AI2

Les travaux évoqués ici sont mes travaux de thèse, effectuée au LGC de Toulouse sous la direction d'Hélène Roux-de Balman au sein du département GIMD du LGC. Ils sont une contribution aux recherches du LGC dans le domaine des procédés de filtration membranaire, axe historiquement fort de ce laboratoire. Ils s'inscrivaient à l'époque dans la cadre d'un partenariat entre le LGC et l'entreprise Eurodia, principal fournisseur européen d'équipement d'électrodialyse. J'ai bénéficié d'une bourse de docteur ingénieur (BDI) cofinancée par Eurodia et le CNRS pour réaliser ces travaux.

Le contexte général de ces recherches était l'amélioration des procédés de production d'acides organiques. Les acides organiques (lactique, citrique, gluconique) sont utilisés dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires et représentent un marché en continuelle expansion. Ces composés sont principalement produits par fermentation. Après clarification, le jus de fermentation contient l'acide sous une forme dissociée (e.g. sel de sodium) et des impuretés résiduelles dont des sucres et des sels minéraux. Il s'agit par la suite de convertir l'acide sous sa forme non dissociée et d'éliminer les impuretés pour obtenir un produit aux propriétés d'usage voulues. Traditionnellement, l'étape de conversion du sel d'acide en son acide conjugué était opérée par précipitation. Mais la précipitation a pour inconvénient majeur d'utiliser de grandes quantités d'acide et de générer des volumes importants d'effluents minéraux non valorisables. Les contraintes environnementales ont donc poussé au développement de techniques plus propres de conversion du sel d'acide. Parmi celles-ci, l'électrodialyse à membranes bipolaires (EDMB) permet de convertir le sel d'acide sans ajout ni création d'un produit tiers par migration sélective des espèces à travers des membranes échangeuses d'ions.¹ Des étapes de purification n'en restent pas moins nécessaires pour compléter le procédé : avant conversion pour éliminer les cations divalents présents dans les jus et qui affectent la durée de vie des membranes d'EDMB, après conversion pour éliminer le glucose des jus convertis.

A mon arrivée au LGC, les procédés de production d'acides organiques fondés sur une étape d'EDMB étaient en plein développement. L'entreprise Eurodia proposait déjà des installations à la vente, mais cherchait à améliorer le procédé et à en diminuer les coûts d'opération. Une voie d'amélioration consistait à optimiser les étapes de purification avant et après EDMB. Des travaux antérieurs au LGC avaient notamment suggéré que la nanofiltration pouvait être utilisée pour ces étapes à la place de techniques plus coûteuses et plus difficiles à mettre en œuvre comme les résines échangeuses d'ions par exemple. L'objectif de ma thèse était d'évaluer cette proposition.

La nanofiltration est une opération de filtration membranaire qui permet de séparer des molécules présentes en solution aqueuse sous l'effet d'un gradient de pression hydrostatique. Les membranes de nanofiltration sont poreuses avec des diamètres de pores de l'ordre du nanomètre. Elles sont également chargées avec des charges fixes qui varient selon le pH et le matériau membranaire. Les

mécanismes de sélectivité de la nanofiltration sont régis à la fois par des effets de taille et de charge. Les molécules neutres sont retenues par des effets de taille uniquement, avec des rétentions totales pour les molécules de taille supérieure à 1-2 nm environ. A taille identique, les composés chargés sont quant à eux d'autant plus retenus que leur charge est élevée (e.g. mono- contre divalent) et de même signe que la charge de la membrane.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé principalement à la production d'acide lactique à partir d'un jus de fermentation de lactate de sodium. Dans ce cas, la nanofiltration était a priori utilisable à la fois en amont et en aval de la conversion par EDMB. L'idée était à chaque fois de retenir les impuretés de type ions divalents et glucose et de laisser passer le lactate de sodium ou l'acide lactique, plus petit et/ou moins chargé, à travers la membrane. Le travail expérimental a consisté à évaluer chacune de ces possibilités en utilisant une membrane de nanofiltration aux caractéristiques connues et une installation pilote de petite envergure (membrane de $\sim 150 \text{ cm}^2$). Afin de comprendre au mieux les phénomènes de sélectivité, notre choix a été d'utiliser des solutions modèles ne comportant qu'un ou deux composé(s) à des concentrations qui correspondent à celles de jus de fermentation : eau + acide lactique, eau + lactate de sodium, eau + glucose, mélanges. Des expériences sur des jus de fermentation réels de composition beaucoup plus complexe que ces solutions simples ont été réalisées en fin de thèse.

Un résultat majeur de ce travail est d'avoir mis en évidence des phénomènes inédits d'interactions entre solutés neutres et chargés en nanofiltration. Ceci est illustré sur la Fig.1 ci-dessous.

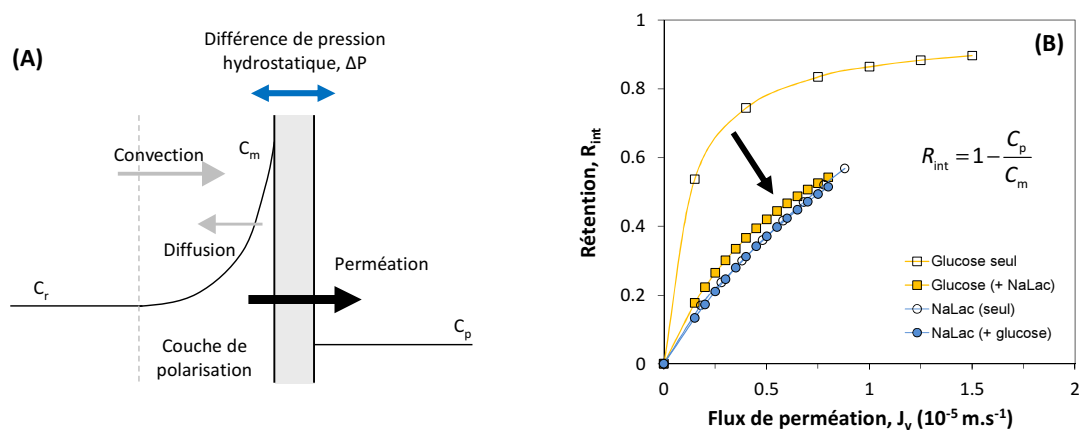


Fig.1. (A) Principe d'une filtration sur membrane, (B) Sélectivité d'une membrane de nanofiltration vis à vis de solutions contenant 0.1 M de glucose et/ou 0.5 M de lactate de sodium.

La sélectivité d'une membrane de filtration vis à vis d'un composé se mesure via une rétention intrinsèque R_{int} définie à partir des concentrations de ce soluté de part et d'autre de la membrane, C_p et C_m (Fig.1A) : la rétention est nulle quand $C_p = C_m$, elle est totale quand C_p est nulle. Pour les composés plus petits que les pores, la rétention n'est jamais totale mais dépend du flux de perméation J_v à travers la membrane (Fig.1B). A flux nul, le composé diffuse librement à travers la membrane et il n'y a pas de rétention. A mesure que le flux de perméation augmente, la rétention

augmente jusqu'à atteindre une valeur plateau qui dépend des caractéristiques du soluté et de la membrane.

La sélectivité de la nanofiltration vis à vis du glucose et du lactate de sodium est donnée sur la Fig.1(B). Comme attendu, en solution simple d'un unique composé (symboles vides), la rétention du glucose est toujours supérieure à celle du lactate de sodium en raison de la différence de taille entre les deux solutés : 7 Å pour le glucose, 4.6 Å pour le lactate. Le résultat est beaucoup plus surprenant lorsque les deux composés sont présents ensemble en solution (symboles pleins). Dans ce cas en effet, la rétention du glucose chute de moitié par rapport à ce qui est mesuré en solution simple. A l'inverse, la rétention du lactate de sodium n'est pas affectée par la présence de glucose. Cette chute de rétention du glucose est un phénomène complètement inattendu qui, au moment de sa découverte, n'avait jamais été reporté en filtration membranaire. De plus, cet effet n'existe pas dans les mélanges acide lactique / glucose, et c'est donc la nature *chargée* du lactate de sodium qui modifie la rétention du glucose. Nous avons de plus retrouvé un effet de ce type sur des mélanges NaCl / glucose, indiquant qu'il s'agit là probablement d'un effet générique d'interactions neutre-charge en nanofiltration.

En tant qu'espèce non chargée, le glucose n'est retenu que par des effets de taille en nanofiltration. Dès lors, la diminution de sa rétention peut s'expliquer par (i) une augmentation de la taille moyenne des pores de la membrane, (ii) une diminution de la taille apparente du glucose, (iii) une combinaison des deux phénomènes. L'hypothèse la plus probable est celle de la diminution de la taille apparente du glucose en présence de sel; la taille apparente étant la taille de l'objet *glucose* et du cortège de molécules d'eau qui l'entourent. La présence de sel viendrait déstabiliser et/ou amenuiser cette couche d'hydratation. La molécule de glucose devient alors plus petite du point de vue de la nanofiltration et son passage est facilité. Nous avons proposé que ce phénomène était certainement à rapprocher des effets de *salting-out* mis en évidence par Hofmeister en 1888 et qui dépendent de la nature et de la concentration des ions mis en jeu.²

A mon sens, ces résultats constituent une avancée importante dans l'identification des mécanismes de rétention en nanofiltration. Nous les avons publiés en 2005 dans *Journal of membrane science* (article A11). La même année, une équipe néerlandaise publiait dans le même journal une étude aux résultats très proches des nôtres sur des mélanges glucose/NaCl.³ Ces deux articles sont à ma connaissance les premiers à rapporter de tels effets d'interaction neutre-charge en filtration. Ils ont depuis été suivis de nombreuses études visant à comprendre ces effets et à (in-)valider les hypothèses permettant de les décrire.⁴⁻⁶ A l'heure actuelle, ces phénomènes sont toujours en cours d'investigation. Au LGC, l'équipe d'Hélène Roux de Balmann travaille d'ailleurs toujours en partie à leur élucidation.⁷⁻⁹

Du point de vue applicatif, les résultats d'expériences de nanofiltration sur jus de fermentation réels ont permis de répondre plus directement à la question de l'intégration de cette opération dans les procédés de production d'acides organiques. En particulier, nous avons montré que la nanofiltration retient de manière satisfaisante l'ensemble des sels divalents présents dans les jus de fermentation de lactate de sodium (article A12). Ceci permet de réaliser la conversion par EDMB à de faibles taux d'ions divalents et de préserver ainsi l'intégrité des membranes échangeuses d'ions. A l'heure actuelle, je n'ai pas d'informations précises sur l'utilisation de la nanofiltration dans les procédés

qu'Eurodia conçoit et propose à la vente. Toujours est-il que l'entreprise revendique à présent une activité *nanofiltration* et que mes travaux de thèse ont certainement contribué à son émergence.

***Nuclear pore complex* et microscopie à force atomique**

A la suite de ma thèse, j'ai accepté une proposition de postdoc dans l'équipe de Georges Belfort aux Etats-Unis (RPI, NY). Les travaux de Georges Belfort sont connus et respectés dans le domaine de la filtration membranaire, en particulier en ce qui concerne la sélectivité des opérations d'ultra- et de microfiltration.¹⁰ Mais c'est un sujet relativement différent qui m'a occupé durant mon séjour au RPI puisqu'il s'agissait d'étudier la sélectivité d'une membrane *biologique* et non synthétique. Ces travaux s'inscrivaient à l'époque dans le cadre d'un projet d'envergure (bourse *Nanogrant* des *National institutes of health*) déposé par la *Rockefeller university* de New York en collaboration avec l'université de Münster en Allemagne et le RPI.

Le projet avait pour objet d'étude le *nuclear pore complex* (NPC), assemblage complexe de protéines qui constitue les pores des membranes nucléaires des cellules biologiques eucaryotes.¹¹ Les NPC sont les principaux médiateurs de transport de protéines entre cytoplasme et noyau cellulaire. Ces petites machines protéiques possèdent une sélectivité étonnante dont les mécanismes étaient et sont encore très mal connus.¹² Une des hypothèses couramment avancées repose sur l'existence d'interactions moléculaires spécifiques entre des protéines-filaments (intrinsèquement désordonnées) émanant du pore central du NPC (les FG nucléoporines ou FG-Nups, Fig.2A) et des protéines chaperonnes présentes en solutions dans le cytoplasme et le noyau (les karyophérines ou Kaps). Les protéines qui traversent le NPC librement sont celles qui comportent une séquence particulière leur permettant de s'associer à une protéine chaperonne. Le complexe ainsi formé est reconnu par le NPC grâce aux interactions spécifiques entre Kaps et FG-Nups, et peut donc être transporté le long du pore central.

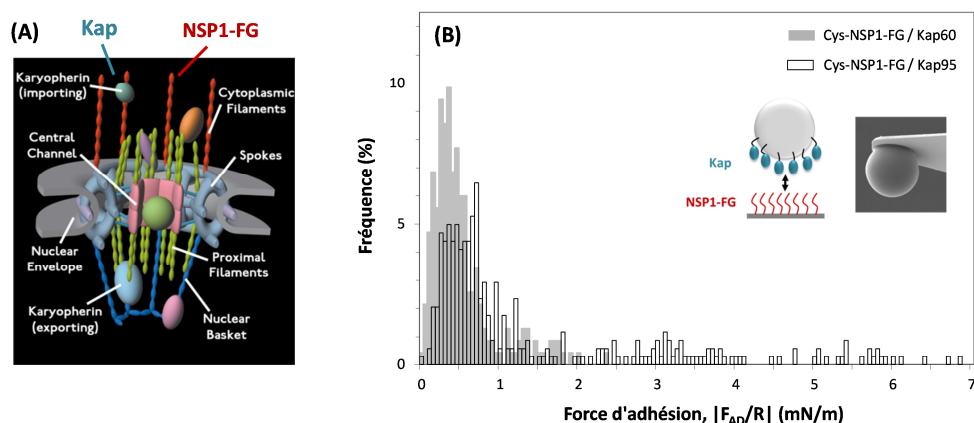


Fig.2. (A) Le *nuclear pore complex*, (B) Mesures par AFM de forces d'adhésion entre protéines constitutives du NPC et protéines chaperonnes.

Mon travail a consisté à vérifier l'existence d'interactions spécifiques entre FG-Nups et Kaps par microscopie à force atomique. L'AFM permet en effet de mesurer des forces de l'ordre du piconewton entre des entités microscopiques comme des protéines. Il est pour cela nécessaire d'immobiliser une des protéines d'intérêt sur une surface, tandis que l'autre protéine est immobilisée sur une bille d'environ 10 μm elle-même collée au bout d'une pointe AFM (insert Fig.2B). Selon l'approximation de Derjaguin, et moyennant une normalisation par le rayon R de la bille, la force mesurée entre bille et surface est alors assimilable à l'énergie d'interaction entre deux plans.¹³ Dans le cas qui nous intéresse, le principe de la mesure AFM est d'amener la bille au contact de la surface, de la laisser y adhérer pendant un temps donné, et de la retirer jusqu'à détachement. La force d'adhésion F_{AD} est la force maximale enregistrée par l'AFM au moment du détachement.

La Fig.2B donne les résultats de mesures réalisées entre FG-Nups et des karyophérines ayant des affinités différentes pour les nucléoporines : Kap95, forte affinité, et Kap60, faible affinité. Les Kaps sont immobilisés sur les billes via leurs résidus lysine en utilisant une chimie classique de greffage de type EDC/NHS. Les FG-Nups sont quant à eux modifiés en bout de chaîne par l'ajout d'un résidu cystéine qui a une grande affinité pour l'or. Ils sont immobilisés sur des surfaces recouvertes d'une fine couche d'or de façon à former une *brosse* de protéines similaire à ce que l'on retrouve à l'entrée du NPC. Les énergies d'adhésion mesurées entre FG-Nups et Kap60 sont pour la plupart comprises entre 0 et 2 mN/m et sont plus probablement le fait d'interactions non-spécifiques entre ces deux entités. A l'inverse, la moitié des événements d'adhésion entre FG-Nups et Kap95 mettent en œuvre des énergies plus grandes comprises entre 2 et 7 mN/m, ce qui signerait l'existence d'interactions spécifiques.

Mon séjour aux Etats-Unis n'a duré que neuf mois, et je n'ai pas pu finaliser complètement ces expériences et élargir les mesures à des systèmes moins connus et peut-être plus intéressants. Aussi ces mesures par AFM n'ont pas été reprises par un étudiant ou postdoctorant à mon départ. Il n'y a donc pas eu de valorisation de ces résultats hormis deux posters et une présentation dans un congrès. Mais je tenais à les présenter brièvement dans ce document car cette expérience postdoctorale m'a permis d'aborder des techniques et concepts que j'ai continué d'utiliser par la suite dans mon parcours de chercheur.

2.2 Comprendre et modéliser la filtration du lait

Les activités de recherche que je présente dans cette partie concernent directement la thématique qui m'a été confiée à mon recrutement au laboratoire STLO de Rennes en janvier 2006; à savoir la filtration du lait, sa compréhension, et sa modélisation. Ces recherches ont donné lieu à une dizaine d'articles, ce qui constitue une part importante de mon travail de chercheur jusqu'à présent. Suite à mon départ sur Toulouse et mon affiliation au LISBP, je ne travaille dorénavant plus sur cette thématique.

L'UMR STLO est née en janvier 2004 de la fusion du laboratoire de recherche en technologie laitière et du laboratoire de technologie des ovoproduits. Le STLO regroupe aujourd'hui environ 70 permanents, et relève de deux départements INRA de tutelle: Microbiologie et Chaîne Alimentaire (MICA, ~1/3 des effectifs) et Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture (CEPIA, ~2/3 des effectifs). Les activités de l'UMR s'articulent autour de différents thèmes liés à la connaissance et à la maîtrise de la qualité, de la fonctionnalité et de la transformation des produits issus du lait et de l'œuf. Le STLO est actuellement organisé en 5 équipes de recherche recouvrant ces thèmes : microbiologie des filières lait et œuf, physico-chimie des protéines et des lipides, bioactivité et nutrition, procédés de séparation par membrane, procédés de séchage. Il en résulte un environnement très multidisciplinaire alliant biochimie, physico-chimie des protéines, microbiologie et génie des procédés.

Sur la période 2006-2013, le STLO était structuré légèrement différemment à maintenant. Les recherches concernant les opérations de filtration et de séchage étaient menées au sein d'une même équipe intitulée *procédés pour l'industrie laitière* (acronyme TIPIL). L'objectif finalisé de ces recherches était de parvenir à maîtriser ces opérations et de contrôler la qualité des produits qui en sont issus. TIPIL était une équipe de taille moyenne regroupant alors 4 ingénieurs (IE/IR), 8 techniciens, 5 chercheurs et enseignant-chercheurs et environ 10 doctorants. Mes activités de recherche concernaient bien sûr la partie *filtration* de cette équipe. A mon arrivée au STLO, cette composante était portée par une unique scientifique, Geneviève Gésan-Guizieu, DR INRA et deux techniciennes (Nadine Leconte et Fabienne Lambrouin). A présent, les activités filtration du STLO sont rassemblées dans une équipe indépendante (PSM, *procédé de séparation par membrane*), qui a récemment accueilli un second scientifique, Maksym Loginov, CR INRA depuis septembre 2016.

2.2.1 Problématique et stratégie adoptée

Depuis sa création, l'INRA a été à la source de nombreuses innovations dans les domaines des sciences et des technologies laitières. Outre l'approfondissement de la connaissance des composants du lait et la recherche systématique de nouvelles voies de leur valorisation, une partie importante des travaux a concerné, et concerne encore, l'amélioration des procédés de transformation du lait en produits conventionnels, e.g. lait de consommation, laits fermentés, fromages. Dans ce contexte, les technologies à membrane ont très tôt été identifiées comme des opérations pouvant permettre une amélioration globale de ces procédés. Ce succès repose sur le fait que les techniques de filtration membranaire sont capables d'effectuer des séparations fines au sein de solutions complexes comme

le lait. Elles ont également pour avantages de ne pas altérer les propriétés organoleptiques des fluides traités et d'être parfaitement adaptées aux normes d'hygiène de l'industrie agroalimentaire.

Le lait est en majorité composé d'eau, de lactose, de matière grasse, de sels minéraux et de protéines (Fig.3A). Parmi ces dernières, il convient de distinguer les protéines dites *solubles* du lait (α -lactalbumine, β -lactoglobuline, immunoglobuline) des caséines, présentes sous la forme d'agrégats colloïdaux de 10^4 à 10^5 unités et environ 200 nm de diamètre appelées *micelles de caséine*. Le lait *brut* contient également inévitablement des bactéries récoltées au cours des opérations de traite et de collecte.

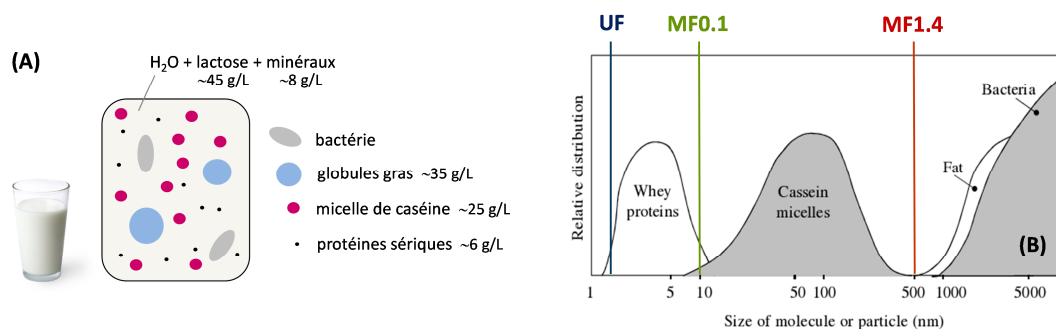


Fig.3. (A) Composition moyenne d'un lait de vache, (B) Distribution de taille des composés majoritaires du lait et seuils de coupure de l'ultrafiltration (UF) et de la microfiltration 0.1 µm (MF0.1) et 1.4 µm (MF1.4), figure adaptée de James et al.¹⁴

Suivant le seuil de coupure des membranes utilisées, les techniques de séparation membranaires peuvent être utilisées de différentes manières pour le traitement du lait (Fig.3B).¹⁵ La technique la plus répandue dans l'industrie laitière est l'ultrafiltration. Elle permet de concentrer la totalité des protéines du lait (protéines solubles et micelles de caséine, retenues par la membrane), et ainsi de standardiser les laits avant transformation et de limiter les volumes manipulés en fromagerie. La microfiltration peut quant à elle, selon la taille de pore des membranes, servir à éliminer les bactéries indésirables ou pathogènes d'un lait (MF1.4) ou encore à fractionner un lait afin d'en extraire les composés voulus (séparation micelles de caséine / protéines solubles, MF0.1).

Les opérations de filtration sont dans tous les cas opérées en mode tangentiel, cad que le fluide circule de façon tangentielle à la paroi de la membrane. La filtration est réalisée à travers l'application d'une pression hydrostatique sur le fluide circulant. L'écoulement tangentiel a pour effet de limiter les effets de surconcentration à la membrane par des phénomènes de *shear-induced back-diffusion* (comme décrit par exemple dans la *review* historique de Georges Belfort sur la microfiltration...¹⁰). Il n'en demeure pas moins que le phénomène de polarisation de concentration persiste dans tous les cas, la rétrodiffusion des espèces retenues n'étant jamais suffisante pour contrecarrer complètement l'accumulation induite par le flux convectif vers la membrane.

Les procédés à membranes ont connu un développement extrêmement rapide dans la filière lait, si bien que leur conduite est encore hasardeuse et que de nombreuses questions scientifiques

demeurent quant aux mécanismes de transfert qu'elles impliquent. Le facteur principal limitant les performances de l'ultra- et de la microfiltration tangentielle d'un lait est la formation d'un dépôt de micelles de caséines en surface de la membrane. Ce dépôt affecte la perméabilité de la membrane et donc le rendement de l'opération. Il peut également, et c'est le cas particulièrement lors de la microfiltration d'un lait, modifier la sélectivité de la membrane envers les protéines solubles lors de la filtration (par augmentation de leur rétention). L'opération perd alors son caractère discriminatoire envers les protéines solubles et les micelles de caséine, et par conséquent son efficacité.

Comme illustré sur la figure suivante (Fig.4), l'apparition du dépôt dépend étroitement des conditions opératoires de filtration.¹⁶ Dans le cas (A), le flux tangentiel à la paroi est suffisamment important pour limiter l'accumulation des micelles de caséine à la surface de la membrane. Il n'y a pas formation de dépôt et l'accumulation n'est pas suffisante pour gêner le transfert d'eau et, dans le cas de la microfiltration, modifier la transmission des protéines sériques. Dans le cas (B), le flux tangentiel n'est pas suffisamment important et l'accumulation est telle qu'il y a formation du dépôt de micelles de caséine à la membrane. La résistance hydraulique augmente excessivement jusqu'à diverger (= la filtration est quasi-stoppée) et la transmission des protéines chute drastiquement.

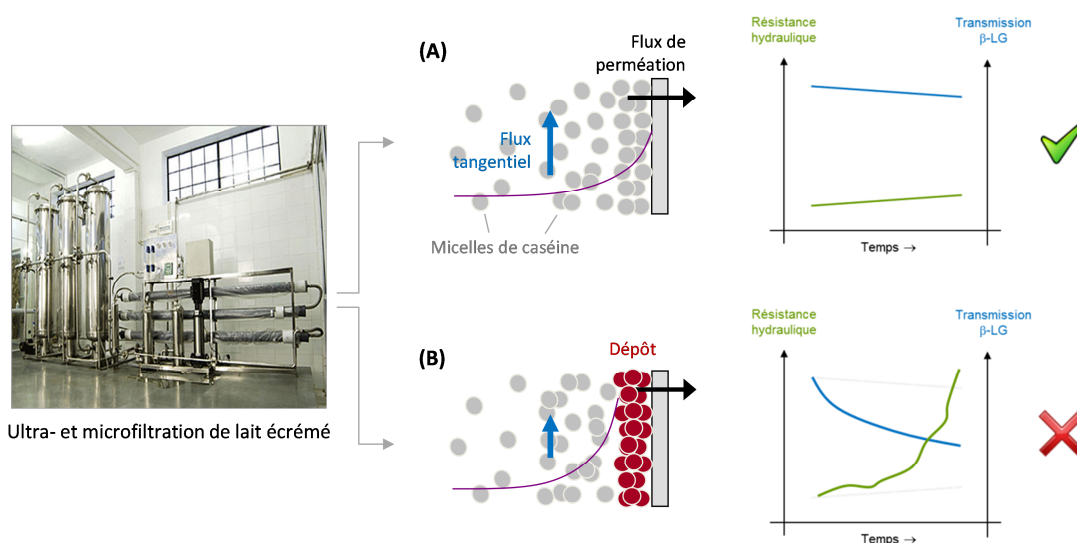


Fig.4. Représentation schématique de l'ultra- ou microfiltration tangentielle d'un lait écrémé : (A) Conditions stables, (B) Conditions instables. La résistance hydraulique est une mesure de la résistance au transfert d'eau à travers la membrane à une pression transmembranaire donnée. β -LG = β -lactoglobuline.

Afin de maîtriser l'opération de filtration, la question essentielle est donc d'élucider les mécanismes responsables de l'apparition du dépôt de micelles de caséine. En 2006, cette question était abordée dans l'équipe TIPIL à travers des approches relevant essentiellement du génie des procédés *classique*. La plupart des travaux étaient menés sur des installations pilotes de filtration avec pour objectif, par exemple, de déterminer précisément les conditions d'apparition du dépôt via un suivi rigoureux des performances de filtration en termes de flux et de sélectivité.¹⁶⁻¹⁸

A mon arrivée, j'ai élaboré un projet de recherche visant à compléter ces approches par une caractérisation fine des phénomènes d'interaction, de transition de phase et de structuration dans les dépôts de micelles de caséine. Pour cela, l'approche expérimentale consistait à *sortir* du procédé, produire des dispersions de micelles de caséines à des concentrations similaires à celles retrouvées en filtration à la surface des membranes, et déployer un arsenal analytique adapté pour caractériser les propriétés qui m'intéressaient. Je proposais ainsi de répondre aux questions suivantes :

- (i) Quelles interactions sont mises en jeu lorsque l'on concentre une dispersion de micelles de caséines ? Quel lien entre ces interactions et le comportement de phase des dispersions ?
- (ii) Dans quelle mesure le dépôt est-il cohésif ? Comment expliquer cette cohésion ?
- (iii) Quelle organisation adoptent les micelles de caséines en fonction de la concentration ? Quelle est la structure des dépôts ?
- (iv) Quelles sont les propriétés de transfert et de diffusion des dispersions de micelles de caséine ? Comment ces propriétés évoluent avec la concentration ?

Mes travaux de recherche en lien avec ces questions sont présentés dans la partie suivante, 2.2.2. *Suspensions concentrées de micelles de caséine.*

A partir de cette caractérisation *hors-procédé*, l'idée était ensuite de revenir à l'opération de filtration en tant que telle et de pouvoir en proposer une description plus juste et plus précise. Toujours à partir de ce travail de caractérisation, un objectif majeur était aussi d'élaborer un modèle de filtration capable de prédire les performances de l'opération. Je m'inspirais pour cela des derniers développements théoriques dans le domaine de la filtration d'espèces colloïdales, qui montraient qu'il était possible de construire des modèles de filtration à partir de la mesure des interactions entre colloïdes en fonction de la concentration.¹⁹⁻²¹ Je présente l'ensemble de ces travaux dans la partie 2.2.3. *Description et modélisation de la filtration.*

Cette façon d'appréhender le problème de la filtration membranaire du lait était alors très nouvelle au STLO, d'autant que les concepts et outils expérimentaux nécessaires pour mener à bien ce projet - ceux de la physique des colloïdes et de la matière molle - étaient alors peu connus au laboratoire (citons toutefois les travaux de Stéphane Pézennec avec l'IPR de Rennes^{22,23} et les collaborations que venaient d'engager Geneviève Gésan-Guizieu avec le laboratoire de rhéologie de Grenoble^{24,25}). De mon côté, je n'étais pas non plus particulièrement familier de ces disciplines, mais je m'y suis formé à travers des lectures, une confrontation directe à l'expérience, et surtout certaines collaborations clés comme celle que j'entretiens avec Bernard Cabane depuis 2006.

L'intérêt des physiciens de la matière molle pour les protéines et notamment les protéines alimentaires a semble-t-il toujours existé. Je pense par exemple aux nombreux et excellents articles de Kees de Kruif de l'université d'Utrecht par exemple, décédé en janvier 2016. Mais j'ai le sentiment que cet intérêt s'est encore renforcé à cette époque - encore récente - des années 2000-2005 à travers les travaux de chercheurs comme Peter Schurtenberger et Anna Stradner, actuellement à l'université de Lund, ou encore Raffaele Mezzenga à Zurich par exemple.²⁶⁻²⁸ Les orientations que je décidais de prendre au STLO à cette période découlent bien sûr en partie de ce contexte de l'époque.

2.2.2 Suspensions concentrées de micelles de caséine

Il convient dans un premier temps de présenter l'objet *micelle de caséine*^c tel qu'il était connu en 2006. Sa description n'a pas foncièrement changée depuis, si ce n'est les quelques précisions structurales que mes collègues et moi avons pu apporter ces dernières années et que je détaille un peu après (partie 2.3). Les propriétés physico-chimiques et structurales de la micelle sont étudiées depuis plus de 50 ans et la littérature est extrêmement abondante sur le sujet. Des chercheurs ont même parfois consacré la quasi-totalité de leur carrière à l'étude de la micelle de caséine; parmi lesquels Pieter Walstra (WUR), Douglas Dalgleish (Guelph, Canada), Kees de Kruif (Utrecht), David S. Horne et Carl Holt (Ayr, Ecosse). Je me limite donc ici aux caractéristiques essentielles de la micelle de caséine, en tentant de donner le maximum d'éléments pour la compréhension de la suite.

Les micelles de caséines représentent 80% de la teneur en protéines du lait bovin. Elles sont le fruit de l'association de 4 protéines naturellement désordonnées, les caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ , et de 8% en masse d'ions phosphate P et calcium Ca, présents dans la structure sous la forme de nanoclusters de CaP d'environ 5 nm de diamètre. Les micelles sont synthétisées dans les cellules épithéliales mammaires selon un mécanisme encore non élucidé,²⁹ et ont la fonction vitale d'apporter au mammifère nouveau-né la quantité de protéines et de minéraux nécessaires à son développement. Les micelles de caséine sont des objets colloïdaux qui présentent une large distribution de taille (40% polydisperse) centrée sur un diamètre moyen compris entre 100 et 200 nm (Fig.5A).^{30,31} Ce sont des objets peu denses dans le sens où ils contiennent énormément d'eau, environ 80% en volume, soit une concentration interne en protéine de l'ordre de 230 g/L.³² La structure de la micelle de caséine, cad la façon dont sont organisés spatialement ces différents constituants (eau - protéines - minéraux), est certainement la question qui a fait le plus débat parmi les chercheurs de la communauté *lait* depuis les années 70.

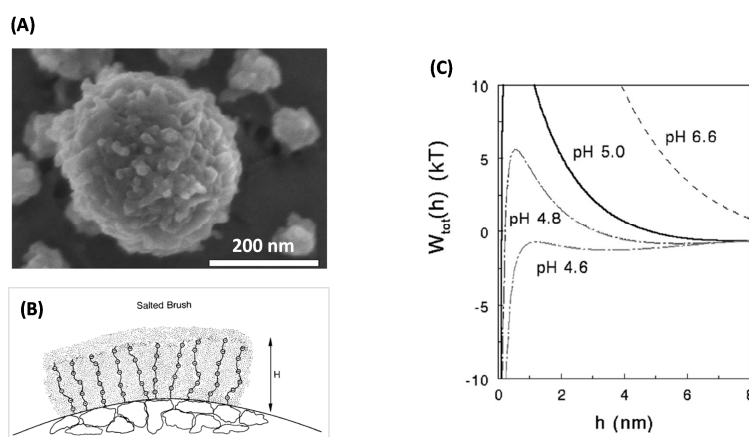


Fig.5. (A) Une micelle de caséine en microscopie électronique à balayage.³¹ (B) Brosse de caséine κ à la surface de la micelle.³³ (C) Potentiel d'interaction en fonction du pH et de la distance entre micelles de caséine, selon Tuinier et de Kruif.³⁴

^cLe terme *micelle* est utilisé de façon universelle par les chercheurs du domaine, bien qu'il ne s'agisse pas exactement d'une micelle au sens de l'IUPAC. L'expression *micelle* est plus généralement utilisée par les physiciens pour désigner des objets cœur-couronne simples constitués de molécules tensio-actives.

Aujourd'hui, et comme c'était déjà le cas en 2006, un consensus existe sur la *structuration externe* de la micelle de caséine. Il a effectivement été démontré que la caséine κ est préférentiellement localisée en périphérie de la micelle; formant ainsi une brosse qui assure la stabilité colloïdale de l'objet (Fig.5B).³⁵ Au pH du lait, la brosse de caséine κ est chargée et parfaitement assimilable à une brosse d'un polyélectrolyte. Toutefois la force ionique du lait est élevée (80 mM) et suffisamment forte pour écranter efficacement les charges. Par conséquent, les répulsions intermicellaires ne sont pas directement de nature électrostatique. Les charges ont pour effet d'assurer la bonne solubilité des brins de caséine κ et ceux-ci agissent alors principalement par effet de répulsion stérique. On parle dans ce cas d'effet *électrostérique*.³⁶ La Fig.5C donne l'évolution du potentiel d'interaction entre deux micelles en fonction de la distance intermicellaire. Ce potentiel est estimé à partir des caractéristiques des brins de caséine κ et il tient compte des forces d'attraction de Van der Waals aux petites distances. Au pH natif du lait (6.6) le potentiel est clairement répulsif et la dispersion de micelles de caséine est stable. Lorsque le pH est abaissé, la charge des brins de caséine κ diminue, la brosse se déshydrate et se rétracte en partie. La portée des forces de répulsion stérique s'en trouve alors diminuée, ce qui affecte directement le potentiel d'interaction. Jusqu'à pH 4.8, ce potentiel reste encore majoritairement répulsif. A pH 4.6, les répulsions ne sont plus suffisantes pour contrecarrer les forces d'attraction. Les micelles s'agrègent et forment un gel. Le processus de fabrication des gels laitiers de type yaourt est fondé sur ce principe de gélification par diminution du pH. Les gels de type fromage sont quant à eux obtenus par l'action d'une enzyme (la chymosine, présente dans la présure) qui vient sectionner les caséines κ présentes à la surface des micelles.

La question de la *structure interne* de la micelle était et est toujours un sujet beaucoup plus controversé. En effet, les différents constituants de la micelle sont en équilibre complexe avec leur environnement : température, pH, force ionique. La micelle de caséine est par conséquent un objet délicat, dynamique, et difficile à observer dans des conditions représentatives de son état natif. Au début des années 2000, les techniques directes et indirectes d'observation mises en œuvre par les chercheurs avaient finis par dégager un certain nombre de traits caractéristiques de cette structure.^{37,38} Mais ces résultats n'étaient pas encore suffisants pour parfaitement discriminer les différents modèles proposés à l'époque; ce qui continuait d'alimenter des débats parfois houleux entre chercheurs.³⁹⁻⁴¹ Pour faire très bref, les modèles de structure encore en cours en 2006 étaient : (1) les modèles à sous-micelles qui décrivaient la micelle comme un agrégat de sous-unités caséiques de ~15 nm de diamètre contenant les nanoclusters de CaP,⁴² (2) les modèles homogènes où protéines et nanoclusters sont distribués dans la micelle de façon uniforme, les nanoclusters jouant le rôle de liant de la structure par interactions spécifiques avec les résidus phosphoserines des caséines.^{38,43} Je reviens sur cette question de la structure interne de la micelle dans la section (iii) *Structuration* de la partie actuelle, et également un peu plus spécifiquement dans la partie 2.3.

(i) Interactions et transition de phase

Articles AI3, AI4

Un des objectifs premiers de mon projet au STLO a été de comprendre et de mesurer les interactions entre micelles de caséine quand on les concentre à des niveaux comparables à ceux obtenus à la surface des membranes de filtration. Il existe plusieurs façons de mesurer des interactions entre espèce colloïdales. Une mesure directe par AFM est possible s'il n'est pas trop difficile d'immobiliser

les espèces sur des surfaces et si l'immobilisation n'entraîne pas de dénaturation des espèces.¹³ Une mesure indirecte est également envisageable par l'intermédiaire d'informations de structure obtenues par diffusion de rayonnement,⁴⁴ mais cette voie peut s'avérer difficile pour des systèmes complexes et polydisperses, et l'accès aux grands instruments est souvent compliqué. Une dernière possibilité consiste à mesurer la variation de pression osmotique de la dispersion en fonction de la concentration en colloïdes. La pression osmotique résulte de l'ensemble des interactions dans le système; elle est une mesure de la résistance du système à sa propre compression ou dégonflement. Pour une dispersion colloïdale simple comme des particules de silice dispersées dans l'eau par exemple, cette résistance résulte des interactions entre les surfaces des particules : plus ces interactions sont répulsives, plus il est difficile de rapprocher les objets les uns des autres en extrayant de l'eau du système, et plus la pression osmotique est grande.

Une technique a priori simple et toujours applicable pour mesurer la pression osmotique d'une dispersion colloïdale est la technique de compression osmotique proposée par Adrian Parsegian et al.⁴⁵ La dispersion est placée dans un boudin de dialyse, lui-même immergé dans une solution d'un polymère dont la pression osmotique est connue (Fig.6). Les sacs de dialyse sont choisis de telle façon que les molécules d'eau et les sels peuvent passer les membranes, tandis que le polymère et les colloïdes ne peuvent le faire. Le polymère choisi pour ce type d'expérience est généralement un PEG ou un dextran, dont les valeurs de pression osmotique sont disponibles dans la littérature et rassemblées sur le *web*.^d Une expérience de compression osmotique peut alors durer jusqu'à 4-6 semaines, temps au cours duquel il y a échange spontané de solvant entre le sac et le réservoir de façon à égaler le potentiel chimique de l'eau dans les deux compartiments. A l'équilibre thermodynamique, la pression osmotique Π dans le sac est identique à celle du réservoir. La concentration C en espèces colloïdales dans le sac est mesurée, donnant ainsi un point de la relation $\Pi = f(C)$. Avec cette méthode, il est possible de couvrir environ 3 décades de pressions osmotiques (du kPa au MPa) et d'atteindre des fractions volumiques en colloïdes de l'ordre de 0.5-0.6.

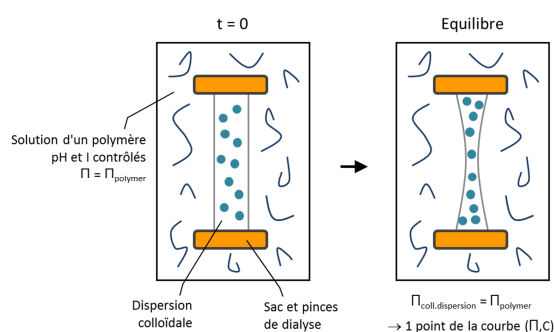


Fig.6. Technique de compression osmotique.

Les pressions osmotiques mesurées de cette façon pour des dispersions de micelles de caséine sont données sur la Fig.7. Aux faibles concentrations en caséine, et jusqu'à environ 125 g/L, les solutions sont turbides et toujours liquides (cf la partie droite de la Fig.7 pour des images des boudins de

^dhttps://brocku.ca/researchers/peter_rand/osmotic/osfile.html (lien valide au 30/03/2017)

dialyse à l'équilibre). Dans ce régime, Π est directement proportionnelle à C , ce qui suggère que les interactions entre micelles sont négligeables et que la pression ne vient que *compter* le nombre d'objets dans les dispersions (analogie de van't Hoff entre solutions et gaz). La pression obtenue est toutefois beaucoup plus grande que celle calculée à partir du nombre de micelles de caséines dans les dispersions, ce qui s'explique par la présence - inévitable - de fragments de micelles et de protéines dans les dispersions. Ces fragments représentent une part infime de la masse en protéines dans la dispersion mais leur densité en nombre est suffisamment élevée pour impacter la pression.

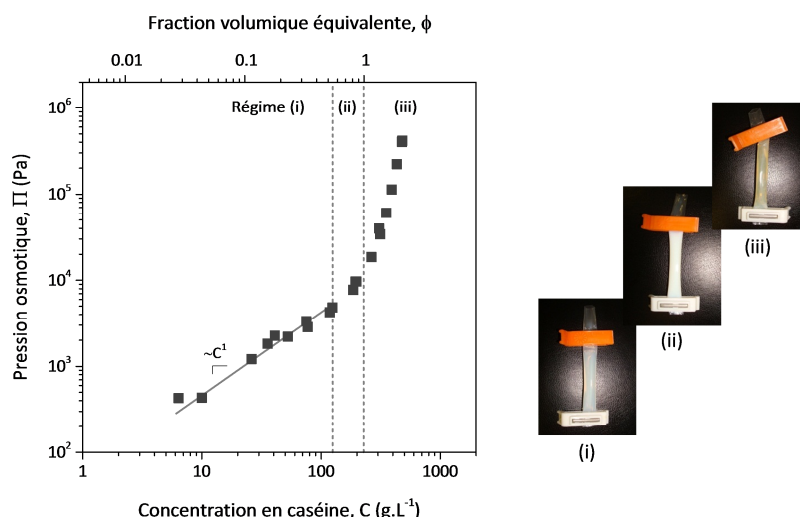


Fig.7. Variation de la pression osmotique de dispersions de micelles de caséine en fonction de la concentration. La fraction volumique en micelle de caséine (axe du haut) est calculée à partir du volume spécifique d'une micelle de caséine native, $v = 4.4 \text{ mL/g}$.³⁰

Dans un second régime, entre 125 et 230 g/L, la fraction volumique en micelle de caséine, estimée à partir du volume initial de l'objet, passe de 0.55 à 1. On vient donc dépasser la fraction volumique maximum d'un empilement de sphères dures (0.64^{46}), ce qui implique que les micelles sont forcées à se rencontrer et à interagir entre elles. La pression osmotique se met alors à diverger avec la concentration et, de manière plus directement palpable, les dispersions passent de l'état liquide à l'état de gel turbe et fragile. Au-delà des 230 g/L, les dispersions résistent beaucoup plus à la compression que dans les régimes précédents, avec une augmentation de la pression osmotique à la puissance 6 avec la concentration. Dans ce cas, les concentrations dans les dispersions sont toutes supérieures à la concentration en caséine dans une micelle *native*. Ce qui implique que de l'eau a nécessairement été extraite de l'intérieur des objets, ceux-ci étant vraisemblablement aux contact les uns des autres dans des configurations de type *nid d'abeille*. Ce sont donc moins les interactions intermicellaires que les interactions intramicellaires qui sont mesurées dans ce régime de concentration. Les dispersions obtenues sont des gels durs et cohésifs qui ont perdu leur turbidité; indication supplémentaire de l'effacement des espaces vides entre micelles à l'entrée de ce régime.

A ce stade, l'analogie entre le comportement de la micelle de caséine est celui d'un microgel (= particule d'un gel, de taille granulaire ou colloïdale) nous est assez naturellement venue à l'esprit :

dans un premier temps la compression rapproche les objets les uns des autres, ils sont ensuite forcés au contact, et enfin après contact la pression les incite à se dégonfler. A l'époque, la communauté *soft matter* s'intéressait de plus en plus au comportement de ce type d'objets, via les travaux de Michel Cloitre ou Walter Richtering sur des microgels de PNIPAM par exemple.^{47,48} Mais il n'existait pas d'étude strictement comparable à la nôtre et rapportant des mesures de pression osmotique (cela est venu un peu après avec les travaux de David Weitz et Paul Menut⁴⁹). Toutefois, à la lecture des travaux émanant de cette communauté, il semblait évident de compléter les mesures de pression osmotique par une caractérisation des propriétés rhéologiques des dispersions de micelles de caséine à mesure que la concentration augmente. La technique de compression osmotique offrait quant à elle la possibilité de produire à façon les échantillons nécessaires à ces mesures. C'est d'ailleurs cette technique de préparation des échantillons que nous avons continué d'utiliser pour la totalité des travaux présentés dans cette partie 2.2.2.

Les résultats de la caractérisation rhéologique des dispersions de micelles de caséine sont réunis sur la figure suivante (Fig.8). L'évolution des propriétés mesurées est parfaitement en phase avec les résultats de compression osmotique et les hypothèses qui s'en dégagent.

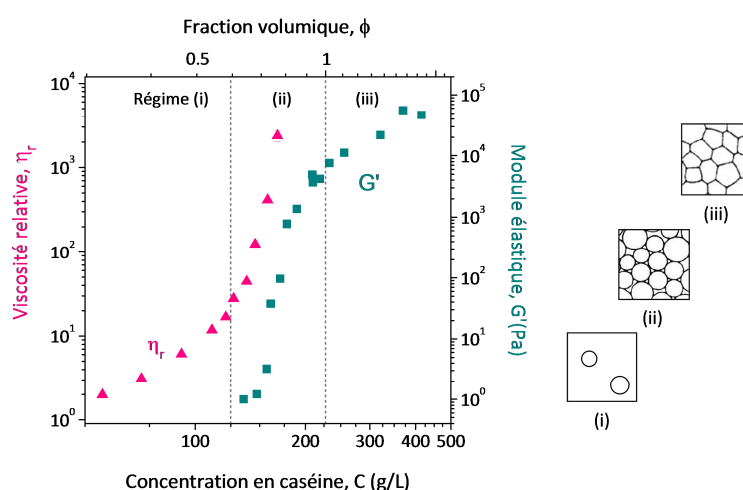


Fig.8. Propriétés rhéologiques de dispersions de micelles de caséine en fonction de la concentration. Les trois régimes de compression mis en évidence par compression osmotique (Fig.7) sont également reportés. Les modules G' sont mesurés à 10 Hz.

Dans le premier régime de concentration, les dispersions sont trop peu concentrées pour présenter un comportement viscoélastique. Seule leur viscosité augmente avec la concentration à la manière d'une suspension de sphères dures. A l'entrée du second régime, le caractère *mou* des micelles de caséines n'est toujours pas sollicité et la viscosité, toujours à l'image de suspensions de sphères dures, diverge à une concentration limite qui correspond à la fraction réelle d'empilement compact de la dispersion (dans ce cas $\phi = 0.78$ en raison de la polydispersité de taille des micelles⁵⁰). Dans le second régime, après cette concentration d'empilement compact, la réponse élastique de la dispersion se fait sentir et la variation du G' marque la transition vers un état gel. Enfin dans le troisième régime de concentration, les propriétés des dispersions sont typiques de celles d'un gel,

avec un module élastique G' élevé (Fig.8), plus important que le module visqueux G'' , et qui varie peu avec la fréquence de sollicitation (cf article AI4).

A l'occasion de ces travaux, il est apparu qu'une seconde analogie intéressante est celle que l'on peut faire entre ces dispersions de micelles et les émulsions de type huile dans l'eau. Les travaux de Thomas G. Mason et David Weitz sont une référence pour ce qui concerne le comportement des émulsions aux fortes concentrations et jusqu'à la fraction volumique limite de 1.^{51,52} Sans rentrer ici dans les détails, nous nous sommes inspirés des modélisations proposées par Mason pour interpréter les données de rhéologie obtenues lorsque les micelles de caséine sont en contact et se déforment les unes contre les autres (régime (ii) et (iii)). Dans une seconde approche, nous avons montré que des modèles de percolation pouvaient aussi expliquer la viscoélasticité des gels de micelles de caséine.⁵³ Dans ce cas, les propriétés élastiques résultent de la résistance à la déformation de liaisons - permanentes ou non - qui sont créées entre les micelles quand on les force au contact. Ces mêmes liaisons seraient également responsables de la cohésion des gels et de leur irréversibilité partielle, ce que je discute dans la section suivante.

(ii) Réversibilité et forces de cohésion

Articles AI3 et AI12

Il nous a très vite semblé intéressant de tester la réversibilité des gels de caséine obtenus par compression, c'est-à-dire leur propension à se redisperser lorsqu'ils sont remis dans leur solvant (lorsque la pression osmotique est pour ainsi dire *relâchée*). La question est intéressante du point de vue du procédé de filtration, pour le nettoyage des installations lorsque le colmatage a eu lieu par exemple. Elle l'est également du point de vue fondamental et de la connaissance de la micelle de caséine, objet dont le processus de gélification par concentration (*jamming*) était peu connu jusqu'alors; les gélifications pH et présure étant les deux grands phénomènes classiquement étudiés par les chercheurs.

La Fig.9 montre les résultats obtenus après redispersion de gels préparés à des pressions osmotiques correspondant aux régimes (ii) et (iii) discutées précédemment (Fig.7). Dans ce cas, les gels sont resuspendus dans leur solvant (de l'eau et des sels) sous forte agitation pendant 15 h. Après une phase de repos de 4 h, la *fraction de gel* est estimée à partir de la concentration en caséines qui n'ont pas sédimentées. Cette fraction mesure l'irréversibilité du gel dans ces conditions. Pour des micelles de caséine comprimées dans leur environnement ionique natif (carrés noirs), le gel présente toujours une part irréversible, de 20 à 80%, et cette part est d'autant plus grande que les micelles ont été comprimées sévèrement. Cette irréversibilité indique qu'il y a formation de liaisons intermicellaires lors de la compression, et que les liaisons établies sont plus nombreuses et/ou plus fortes à compression élevée. Une information supplémentaire est que le gel est d'autant plus irréversible que les micelles sont comprimées à des forces ioniques élevées (diamants et triangles). Les connections intermicellaires s'établissent donc plus facilement dans ces conditions, avec une dépendance moindre de la cohésion finale envers la pression osmotique de préparation.

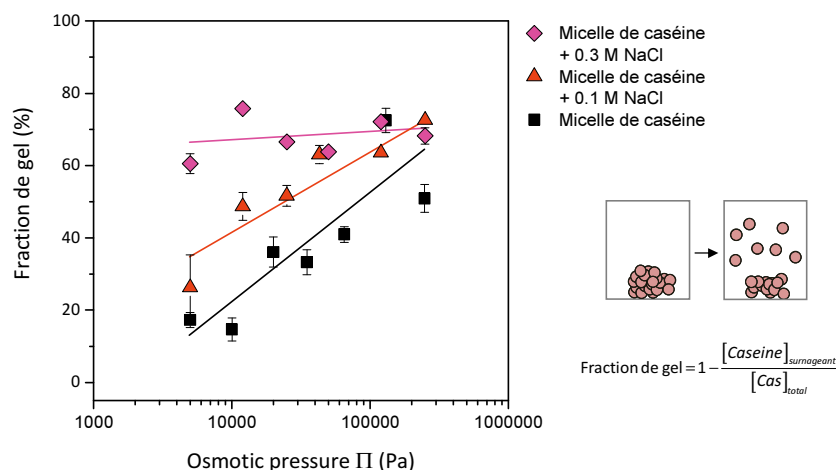


Fig.9. Réversibilité de gels de micelles de caséine obtenus par compression osmotique après resuspension dans leur solvant et 15 h d'agitation. Effet de la présence de NaCl.

Identifier la nature exacte de ces liaisons est une tâche difficile. Elles s'établissent vraisemblablement au moment où la compression est suffisante pour *vaincre* les forces de répulsion de la brosse de caséine κ par un collapse partiel ou total de celle-ci. Plus la compression est forte, plus le contact micelle-micelle est efficace. De la même façon, plus la force ionique est élevée et plus les forces de répulsion électrostatiques sont affaiblies et faciles à dépasser; ce qui faciliterait également le contact intermicellaire. Par ailleurs, il est admis que la brosse de caséine κ ne recouvre pas la surface de la micelle de caséine de manière homogène mais qu'elle est plutôt organisée en *patches* plus ou moins denses et irréguliers.³² Dans ce cas le collapse de la brosse par compression permettrait aux régions localisées entre ces patches d'entrer directement en contact. Or les séquences protéiques qui constituent ces régions sont en grande partie hydrophobes,⁵⁴ ce qui suggère que les liaisons de surface micelle-micelle sont plutôt de type hydrophobe. A noter que ces liaisons sont très probablement de même nature que celles qui conduisent à la gélification présure d'un lait et qui sont également désignées sous le vocable générique d'*hydrophobe*. En effet dans les deux cas, la gélification intervient par altération/dépassement des répulsions entre micelles, mais sans modification des conditions physico-chimiques de leur environnement.

Dans une seconde étude expérimentale, nous avons tenté d'en savoir plus sur ces liaisons intermicellaires, leur durée de vie et les mécanismes qui conduisent à leur formation. Nous avons pour cela testé la stabilité de gels obtenus sur une plus grande plage de pression osmotique (jusqu'à 100 bar) et en dehors de toute agitation cette fois-ci (Fig.10). La cohésion du gel est estimée à travers un *taux de redispersion*, cad le pourcentage de micelles de caséine qui retournent spontanément de l'état gel à l'état dispersion. Ce taux est mesuré à différents temps d'immersion du gel dans son solvant de façon à suivre d'éventuels effets cinétiques.

En accord avec les résultats précédents, les gels préparés à $\Pi = 0.1$ bar sont lâches et peu cohésifs; la compression n'étant pas suffisante dans ce cas pour assurer un contact efficace entre les micelles. Les résultats sont plus surprenants pour les gels préparés à des pressions ≥ 1 bar, notamment en ce qui concerne l'évolution de leur cohésion avec le temps. Aux temps d'immersion les plus courts (4 et

16 h), leur cohésion est quasi-totale et nous sommes là encore en accord qualitatif avec les résultats précédents : la compression a dans tous les cas formé assez de liaisons pour que le gel ne se redisperse pas spontanément (il n'y a pas d'agitation ici, contrairement aux résultats de la Fig.9). Il apparaît par contre que ces gels finissent par se redisperser aux temps longs (64 h et 10 jours), et ce d'autant plus qu'ils ont été préparés à des pressions élevées (!). Pour exemple, un gel préparé à $\Pi = 1$ bar est à 80% intact après 10 jours de *décompression*, tandis qu'un gel préparé à 100 bar se redisperse totalement dans le même laps de temps (le résultat est particulièrement visible sur la Fig.10B). L'origine de ce phénomène est sans doute à chercher dans les premiers instants de la décompression des gels. En effet, des mesures de teneur en eau sur les gels montrent que les micelles recouvrent leur hydratation d'origine dans ces tout premiers instants, de l'ordre de la minute ou de l'heure. L'hypothèse est que cette relaxation rapide des objets constituant les gels vient rompre ou fragiliser les liaisons intermicellaires par effet mécanique. Dans les gels préparés à 1 bar, les micelles sont comprimées à 60% de leur volume initial, si bien que cet effet de relaxation est encore limité. Dans les gels préparés à 100 bar, les micelles ont 30% de leur volume initial. Lorsqu'elles relaxent à leur volume d'origine, il est envisageable que de nombreuses liaisons intermicellaires soient malmenées et fragilisées. La cohésion de l'ensemble en est alors suffisamment affectée pour que le gel puisse se déliter complètement aux temps longs.

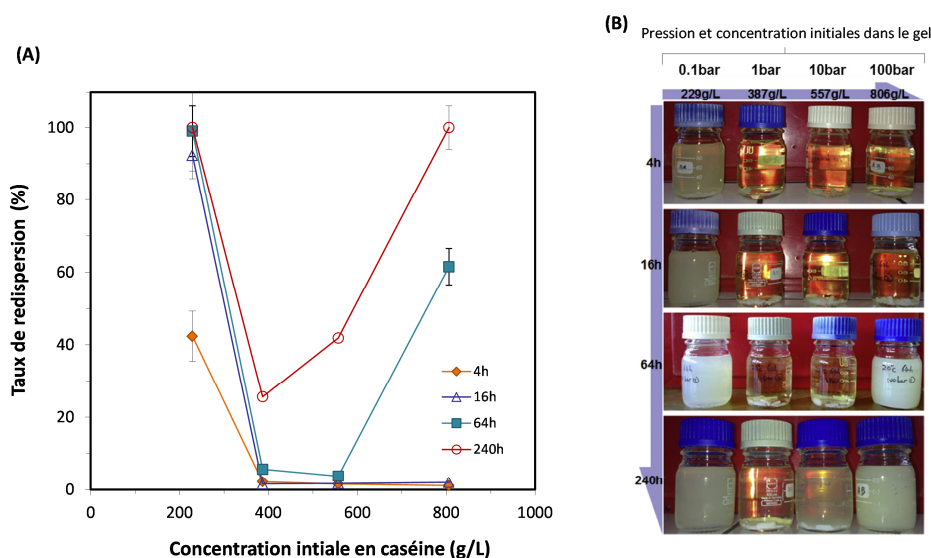


Fig.10. Réversibilité de gels de micelles de caséine obtenus par compression osmotique après resuspension dans leur solvant pendant différents temps, sans agitation.

Afin d'avancer sur cette question de la nature des forces de cohésion entre micelles de caséine, une perspective de ce travail était de mesurer la stabilité des gels en fonction de paramètres physico-chimiques tels que la température ou la présence d'un composé tiers (e.g. urée, sels). Une mesure directe des forces de cohésion micelle-micelle par AFM avait également été envisagée à l'arrivée de l'instrument au STLO. Mon départ pour Toulouse a bien sûr compromis les choses et à ma connaissance personne n'a encore pris le relais sur ce point à Rennes.

(iii) Structuration

Article A15

Les propriétés discutées dans les sections précédentes suggèrent que lorsqu'on les concentre, les micelles de caséines entrent en contact les unes des autres et forment un gel assimilable à un empilement cohésif de microgels. Il paraissait important de confronter cette vision à des mesures directes de la structure des dispersions et de répondre ainsi à des questions relevant de l'organisation des micelles dans le matériau : l'empilement est-il compact ? Existe-t-il une porosité du gel ? Si oui à quelle(s) échelle(s) ? La diffusion de rayonnement (rayons X, neutrons) aux petits angles est une technique qui permet d'obtenir des informations de structure aux échelles souhaitées (1 Å - 500 nm). Elle est de plus parfaitement adaptée à la micelle de caséine comme en témoignaient, à la fin des années 2000, les déjà nombreuses (et contradictoires) études SANS et SAXS de la structure de la micelle de caséine,⁵⁵⁻⁵⁸ études pour autant limitées aux faibles concentrations en caséines. Nous avons donc observé par SAXS des dispersions de micelles de caséine préparées par stress osmotique à des concentrations allant jusqu'à 400 g/L. Notons que de premières mesures SAXS avaient déjà été réalisées à mon arrivée au STLO par Geneviève Gésan-Guizieu sur des couches concentrées de micelles de caséine à la surface de membranes de filtration.^{24,25} Mais les contraintes techniques de ces manipulations ne permettaient pas de dépasser 0.5-0.6 en fraction volumique (~150 g/L), soit la concentration à partir de laquelle les informations de structure sont véritablement intéressantes.

Les spectres SAXS sont rassemblés sur la Fig.11A. Il s'agit d'une représentation de type *Kratky* $q^2 I(q)$ = $f(q)$ qui a l'avantage de mettre en évidence les singularités des courbes obtenues. Sur ce type de spectre, la présence d'une oscillation à un vecteur d'onde q marque l'existence d'une distance caractéristique $d \approx 2\pi/q$ au sein de l'échantillon : corrélations positionnelles entre objets, taille des objets, structure interne, présence de vides, etc.

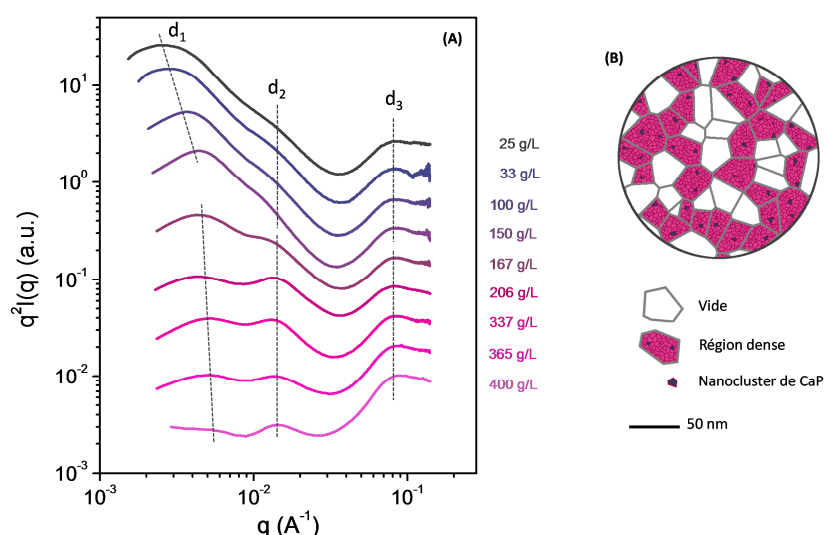


Fig.11. (A) Structure SAXS de dispersions concentrées de micelles de caséine. Les traits pointillés donnent les positions approximatives des trois longueurs caractéristiques de l'objet micelle. (B) Modèle *éponge* de la micelle de caséine

Commençons par décrire le spectre SAXS enregistré à la concentration *native* en caséine dans un lait, $C = 25 \text{ g/L}$. Le spectre présente trois bosses caractéristiques. A $q \approx 2.3 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$, l'oscillation correspond au contour global de l'objet d'une taille moyenne d_1 de l'ordre de 200 nm. Aux vecteurs d'onde les plus grands ($q \approx 7.8 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$), et donc aux échelles de taille les plus petites, l'oscillation correspond aux nanoclusters de phosphate de calcium présents à l'intérieur de l'édifice micellaire, pour un diamètre moyen $d_3 \approx 4\text{-}5 \text{ nm}$. Aux échelles de taille intermédiaires, la troisième et légère oscillation à $q \approx 2.3 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ ($d_2 \approx 40 \text{ nm}$) n'avait été que peu reportée au moment de ces mesures. Elle était interprétée différemment selon les auteurs, notamment en tant qu'indication du positionnement privilégié des nanoclusters de CaP à la périphérie interne de la micelle.⁵⁷

Lorsque la concentration est augmentée, le spectre SAXS évolue différemment suivant que les micelles sont séparées les unes des autres (régime (i) et (ii) des Figs.7 et 8, jusqu'à 150 g/L) ou qu'elles interagissent directement entre elles et forment un gel (régime (ii) et (iii), de 150 à 400 g/L) : . De 25 à 150 g/L, les micelles ne font que se rapprocher les unes des autres. Par conséquent, les distances internes d_2 et d_3 de l'objet n'évoluent pas et les oscillations correspondantes ne changent pas de position en q . L'oscillation à petit q évolue quant à elle vers les plus petites distances. C'est ici la marque classique de l'apparition de corrélations positionnelles entre les objets à mesure qu'on les concentre et non d'une diminution de la taille des objets. Les micelles s'organisent peu à peu entre elles par des effets d'exclusion stérique tout comme dans une dispersion de sphères dures. Cette organisation a pour effet de déprimer l'intensité diffusée à petit q et de décaler le pic d'intensité vers les distances plus faibles.

. De 150 à 400 g/L, le pic d'intensité diffusée à petit q n'évolue plus que très légèrement et s'efface peu à peu au profit des autres oscillations à moyen et grand q . Ceci est tout à fait en accord avec le fait que les micelles entrent au contact et forment un gel continu aux grandes échelles de taille. Le SAXS ne voit plus le contour des micelles car il ne distingue plus les interfaces entre objets quand ceux-ci entre en contact (en lien avec la perte de turbidité, cf Fig.7). Le fait que l'intensité diffusée à petit q s'effondre autant suggère que l'empilement est très compact et contient peu de gros vides. L'évolution du spectre à moyen et grand q est beaucoup plus surprenante à première vue. En effet les distances caractéristiques internes d_2 et d_3 de la micelle n'évoluent pas du tout quand la concentration augmente. Nous sommes cependant dans un régime où la micelle est nécessairement déformée et comprimée, jusqu'à perdre la moitié de son volume initial. Comment dès lors expliquer que les distances internes de l'objet ne sont pas affectées par sa propre déformation ? Nous avons proposé que cette déformation *non-affine* de l'édifice micellaire s'explique par l'existence de régions caséiques denses au sein de la micelle. Ces régions, de diamètres compris entre 10-40 nm, résistent à la compression de la micelle et ne changent donc pas de taille d_2 . Elles sont entourées de *vides* qui s'effacent petit à petit à la compression en libérant le solvant qu'ils contiennent. D'autre part les régions denses contiennent également les nanoclusters de CaP dont la taille d_3 n'est pas non plus affectée par la compression.

On voit donc ici que ces résultats SAXS nous ont en quelque sorte contraints à proposer un nouveau modèle de structure interne de la micelle de caséine (Fig.11B). Nous avons baptisé ce modèle le *modèle éponge*, terme qui commençait à être utilisé par ailleurs pour décrire des clichés Cryo-TEM de la micelle réalisés à la même période.³⁷ Ce modèle de structure interne a très vite été accepté par la communauté, et il est à présent régulièrement cité parmi les modèles les plus réalistes.^{59,60} D'un

autre côté, il existe une controverse récente concernant l'assignation de la dernière oscillation du spectre SAXS au nanoclusters de CaP.⁶¹⁻⁶³ Cette discussion ne remet pas directement en cause notre modèle, mais elle témoigne bien de la sensibilité et de la quasi *immuabilité* de cette question de la structure interne de la micelle de caséine, sujet sur lequel je reviens brièvement dans la partie 2.3.

En plus de leur position en vecteur d'onde q , les oscillations des spectres SAXS de la Fig.11 se caractérisent par une intensité ou *hauteur* relative I_0 . En utilisant un modèle dit à *cellules*, de même type que ceux développés pour décrire des empilements de gouttelettes d'émulsions,⁶⁴ il est possible de traduire ces intensités relatives en fractions volumiques des différentes entités présentes dans l'échantillon : ϕ_1 la fraction volumique en micelles dans la dispersion, ϕ_2 la fraction volumique en régions denses dans la micelle, ϕ_3 la fraction volumique en nanoclusters dans les régions denses. L'évolution de ces fractions volumiques avec la concentration en caséine est donnée sur la Fig.12.

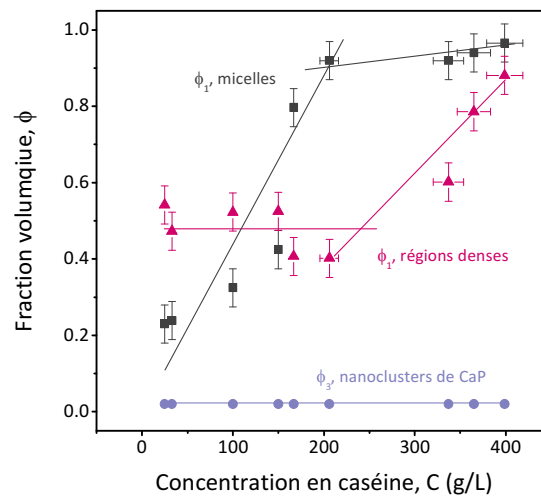


Fig.12. Evolution des fractions volumiques en micelles dans la dispersion (ϕ_0), régions denses dans la micelle (ϕ_1), et nanoclusters dans les régions denses (ϕ_2), en fonction de la concentration totale en caséine dans la dispersion.

Ces résultats apportent des précisions importantes quant à la porosité de l'empilement de micelles de caséine. Ils montrent en effet que les micelles occupent quasiment tout l'espace dans les gels, avec des taux de vide intermicellaire compris entre 10 et 4% seulement en fonction du degré de compression du matériau (carrés noirs, $C > 200$ g/L). Mais la porosité des gels résulte également des vides intramicellaires de taille 10-40 nm. Ces vides représentent environ 50% du volume de la micelle à l'état non comprimé, soit aussi $\sim 50\%$ du volume du gel à $C \approx 200$ g/L. A 400 g/L, ces vides ne représentent plus que $\sim 10\%$ du volume du gel. La porosité est alors principalement assurée par les distances entre chaînes caséiques dans les régions denses, distances que l'on peut estimer à 3-5 nm.⁶⁵

(iv) Propriétés dynamiques et diffusionnelles

Articles AI10, AI14 et AI16

En complément des mesures présentées dans les sections précédentes, nous nous sommes intéressés aux propriétés dynamiques (mobilité des chaînes caséiques) et diffusionnelles (mobilité de traceurs au sein des dispersions) des dispersions de micelles de caséine à mesure qu'on les concentre. Ces propriétés ne peuvent être facilement inférées des autres caractéristiques des dispersions et des mesures expérimentales étaient donc indispensables.

La mobilité ou la dynamique d'un système moléculaire peut être caractérisé par RMN en utilisant des séquences particulières d'impulsion radiofréquence. L'aimantation du système est perturbée par une ou plusieurs impulsion(s) et son retour à l'équilibre est suivi en fonction du temps. Le T_2 ou temps de relaxation spin-spin est une mesure parmi d'autres de ce temps de retour à l'équilibre. Dans le cas d'une dispersion d'un polymère, la dynamique des chaînes polymériques est caractérisée à travers le T_2 des protons *non-échangeables* appartenant aux chaînes en question. Un T_2 grand implique que les chaînes sont mobiles et peu contraintes dans leur déplacement. A l'inverse un T_2 petit implique que l'aimantation retourne vite à son état d'équilibre et que les chaînes sont peu mobiles, très contraintes et/ou en interaction forte avec leur environnement. Par convention, les résultats d'expériences de relaxation sont plutôt discutés en termes de vitesse de relaxation $1/T_2$. Les vitesses $1/T_2$ mesurées pour des dispersions concentrées de micelles de caséine sont reportées dans la figure suivante (Fig.13). Les expériences ont été réalisées sur les instruments RMN de l'IRSTEA de Rennes, en collaboration avec François Mariette, chercheur dans cet institut.

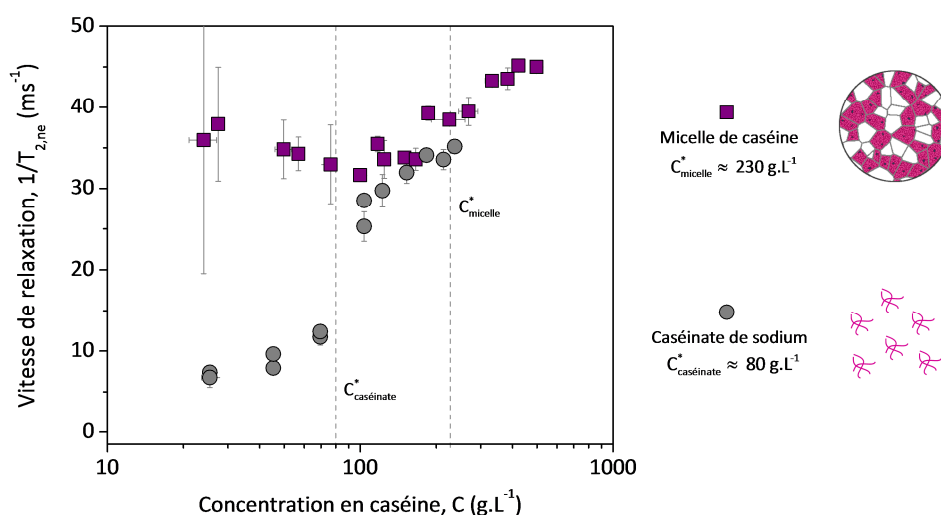


Fig.13. Vitesse de relaxation RMN $1/T_2$ des protons non échangeables des protéines dans des dispersions de caséines micellaires et non micellaires. Variation en fonction de la concentration en caséine. Les C^* sont les concentrations en caséine dans les objets : micelle de caséine dans un cas, petits agrégats caséiques très hydratés dans l'autre.

Ces mesures indiquent que la mobilité des chaînes caséiques n'est pratiquement pas affectée par la concentration dans une gamme allant de 25 à 150 g/L en caséine (carrés mauves). Ce résultat

s'explique par le fait que les micelles de caséine ne font que se rapprocher les unes des autres à ces concentrations et qu'elles ne sont encore ni déformées ni comprimées. Les caséines qui les constituent ne subissent aucune contrainte supplémentaire quand la concentration augmente, et leur mobilité est donc inchangée. A partir de 150 g/L, la vitesse de relaxation $1/T_2$ augmente cette fois-ci légèrement indiquant une diminution de la mobilité des chaînes caséiques. Les interactions entre micelles et la compression des objets les uns contre les autres semblent donc suffisantes pour impacter la mobilité de chaînes les constituant. Des expériences de RMN du solide que nous avons publiées récemment viennent confirmer et préciser ce phénomène (article A16). Ces expériences suggèrent que l'augmentation des contraintes stériques à la compression de la micelle incite les brins de caséines à interagir beaucoup plus fortement avec les nanoclusters de CaP qui leur sont proches. La perte de mobilité des chaînes observée sur la Fig.13 serait donc en partie liée à ces phénomènes d'interaction caséine-CaP aux fortes compressions. A titre d'illustration, la Fig.13 reporte les vitesses de relaxation $1/T_2$ mesurées pour des dispersions de caséines non structurées en micelles car exemptes de Ca et P (caséinate de sodium, cercles grisés). Dans ce cas, les brins de caséine se structurent en petits agrégats de quelques chaînes très hydratés et supposément beaucoup plus lâches qu'une micelle de caséine.⁶⁶ Aux faibles concentrations, les valeurs de $1/T_2$ indiquent que les chaînes caséiques sont effectivement beaucoup plus mobiles que celles constituant les micelles. Aux concentrations plus élevées, et de la même façon que pour les micelles, les vitesses de relaxation augmentent quand les agrégats entrent en contact et s'enchevêtrent les uns dans les autres.

Dans un second temps, nous avons étudié la dynamique et la mobilité de petites molécules dans les dispersions de micelles de caséine et déterminé en quoi cette mobilité est affectée par la concentration du système. L'indicateur à privilégier dans ce cas est bien sûr le coefficient de diffusion de l'espèce. Nous avons mesuré ce coefficient pour des traceurs de natures variées, dans des dispersions de caséine préparées à façon par stress osmotique. Les résultats de ces expériences sont donnés dans la Fig.14.

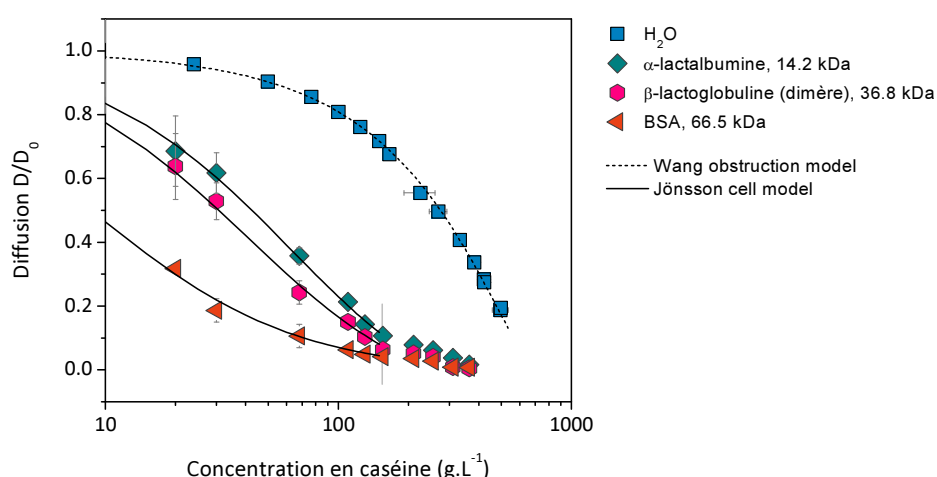


Fig.14. Diffusion des molécules d'eau et de traceurs protéiques dans des dispersions concentrées de micelles de caséine. Les coefficients de diffusion sont normalisés par le coefficient de diffusion D_0 mesuré pour chaque entité à concentration nulle en caséine.

Les mesures de diffusion de l'eau ont été réalisées par RMN, toujours dans le cadre de notre collaboration avec l'IRSTEA. La technique dite à gradients de champ magnétique pulsé a été utilisée. Elle mesure le coefficient d'autodiffusion de l'eau D qui peut être normalisé par sa diffusion D_0 à concentration nulle en caséine. Sans surprise, le D/D_0 de l'eau diminue à mesure que la concentration en caséine augmente, jusqu'à atteindre 20% de sa valeur initiale à 500 g/L de caséines. Pour interpréter cette diminution, différents modèles peuvent être utilisés. Une option raisonnable est de choisir un modèle à obstruction du même type que celui proposé par Wang et al. pour décrire la diffusion de l'eau dans des solutions de protéines pures.^{67,68} Dans ce modèle, la perte de diffusivité de l'eau est due à des phénomènes d'obstruction (une partie du volume n'est pas accessible) couplés à des effets d'hydratation qui *ralentissent* les molécules d'eau en interactions avec les protéines. Ce modèle est parfaitement adapté à nos résultats sur l'ensemble de la gamme de concentration explorée (cf Fig.14). Par ailleurs ce modèle ne tient pas compte de la porosité du milieu, ce qui suggère que la diffusion de l'eau est insensible à l'évolution de la porosité avec la concentration (Fig.12). Ceci paraît tout à fait plausible dans la mesure où les échelles de taille de la porosité des dispersions et des gels (3-100 nm) sont dans tous les cas très supérieures à la taille d'une molécule d'eau (3 Å). En d'autres termes, la molécule d'eau est un traceur trop petit pour être influencé par la structure des dispersions et des gels dans la gamme de concentration étudiée.

Les mesures de diffusion de traceurs protéiques (α -lactalbumine, β -lactoglobuline, BSA) ont été réalisées au STLO par microscopie confocale FRAP. Les espèces sont initialement dispersées de façon homogène dans le medium et c'est aussi leur diffusion brownienne qui est mesurée dans ce cas. Ces trois traceurs ont été choisis parce que ce sont des protéines du lait qui sont amenées à diffuser à travers les couches concentrées de micelles de caséines sur les membranes de microfiltration. Ces trois protéines ont de plus des masses moléculaires et donc des tailles différentes, de 4 à 7 nm de diamètre hydrodynamique. La Fig.14 montre que la diminution de la diffusion en fonction de la concentration en caséine est beaucoup plus marquée pour ces trois traceurs que pour les molécules d'eau. Aussi contrairement au traceur *eau*, la structuration du système a ici un rôle déterminant sur la diffusion des traceurs. En effet dans un premier régime de concentration, pour $C < 150$ g/L, les traceurs peuvent à la fois diffuser entre et à l'intérieur des micelles. Dans ce régime les traceurs perdent leur diffusivité à mesure que les vides intermicellaires s'effacent quand la concentration augmente. Dans un second régime, à $C > 150$ g/L, les traceurs diffusent très majoritairement à l'intérieur des micelles empilées dans le gel. La diffusion est alors très ralentie et dépend nettement moins de la concentration. Nous avons modélisé la perte de diffusion dans le premier régime de concentration uniquement, en utilisant le *cell model* proposé par Bo Jönsson et Håkan Wennerström.⁶⁹ Ce modèle considère que la diffusion globale d'un traceur dépend simplement de sa concentration et de ses propriétés de diffusion dans les deux compartiments que constituent l'extérieur de la micelle (les vides intermicellaires) et la structure interne de la micelle. Par identification du modèle avec nos données expérimentales, nous avons montré que les traceurs protéiques sont présents en très grand nombre à l'intérieur des micelles, et que ce nombre est d'autant plus important que le traceur est gros. Ce résultat, relativement contre-intuitif, s'explique probablement par des effets non-spécifiques d'attraction protéines-caséine, avec des points de contact et d'attraction plus nombreux entre les parois internes de la micelle et la protéine quand celle-ci a une taille hydrodynamique importante.

2.2.3 Description et modélisation de la filtration

Articles AI6, AI9 et AI11

Pour rappel, l'idée maitresse (le pari ?) de mon projet au STLO était qu'une caractérisation fine des systèmes caséiques réalisée *hors procédé* devait nécessairement apporter des éléments clés de compréhension des opérations de filtration des industries laitières. Cette stratégie n'avait de sens que si l'on confrontait effectivement les observations obtenues *ex-situ* à la réalité des opérations de filtration. Une première confrontation de ce type a été réalisée à la faveur des résultats de thèse d'Anne Jimenez, doctorante de Geneviève Gésan-Guizieu qui avait débuté sa thèse peu avant mon arrivée au STLO. Ce travail, résolument axé sur la conduite et l'optimisation de l'opération de filtration, consistait notamment à déterminer quelles sont les conditions opératoires *critiques* à partir desquelles la filtration n'est plus performante. Le principe des expériences effectuées en ce sens est illustré sur la Fig.15A.

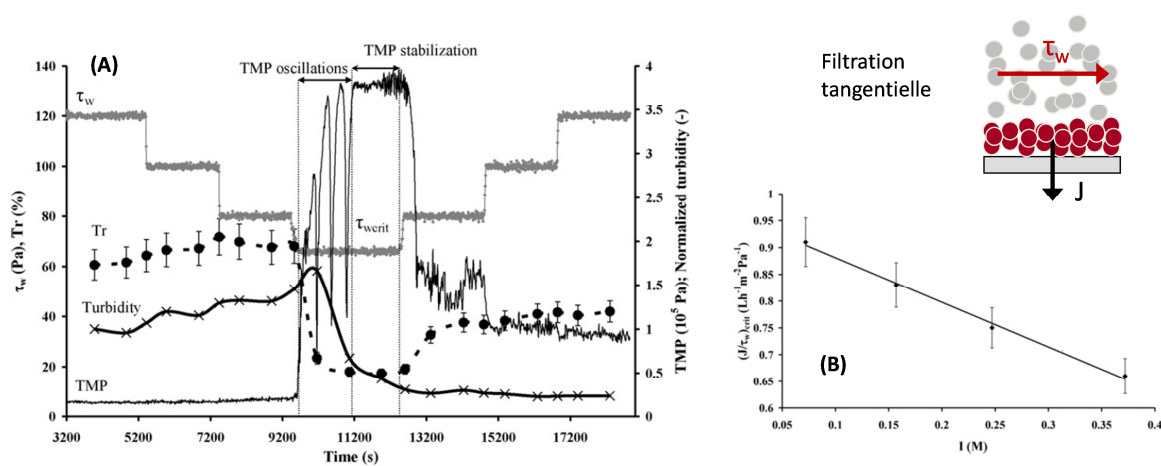


Fig.15. (A) Principe des expériences de microfiltration tangentielle réalisées par Anne Jimenez au cours de sa thèse (article AI6 et Jimenez et al.¹⁷). (B) Evolution du ratio critique (J/τ_w) en fonction de la force ionique (ajout de NaCl).

Il s'agit d'expériences de microfiltration tangentielle pour lesquelles le fluide filtré - un lait écrémé - circule parallèlement à la membrane à une vitesse donnée. Cette vitesse de recirculation peut être changée à volonté et se caractérise à travers une contrainte de cisaillement à la paroi τ_w , contrainte d'autant plus forte que la vitesse est grande. La filtration est menée de façon à ce que le flux de perméation J soit constant tout au long de l'expérience. La filtration débute à une vitesse de recirculation suffisamment importante pour limiter l'accumulation des micelles de caséine à la surface membranaire par les effets déjà évoqués de *shear-induced back-diffusion*. La pression hydrostatique nécessaire pour pousser le fluide à travers la membrane (TMP) est alors stable à 0.2 bar. Aussi 60% des protéines solubles sont transmises à travers la membrane (Tr = transmission), indiquant que la séparation caséine-protéine est particulièrement efficace. A l'issue de cette première étape, la vitesse de recirculation est abaissée par paliers successifs sur des durées d'environ 30 minutes chacun. Les performances de la filtration en termes de pression transmembranaire et transmission en protéines sont stables et inchangées jusqu'à ce que τ_w atteigne une valeur critique

τ_{wcrit} . A cette valeur critique, la pression transmembranaire augmente fortement, oscille, et atteint des valeurs clairement déraisonnables du point de vue énergétique pour une microfiltration. Cette *explosion* de la pression transmembranaire résulte de la formation d'un gel de micelles de caséine à la membrane. Les oscillations de pression témoignent du caractère cohésif de ce gel : il est régulièrement décollé par le cisaillement puis se reforme aussitôt. La transmission des protéines solubles est quant à elle directement affectée par la présence du gel et chute à 20%. Une fois que les conditions critiques sont atteintes, la contrainte τ_w est augmentée à nouveau par palier. Les performances de la filtration ne sont alors pas parfaitement recouvrées. Ceci indique qu'une partie du gel est restée sur la membrane, confirmant ainsi son caractère cohésif et en partie irréversible.

Les conditions hydrodynamiques critiques à partir desquelles la conduite de la filtration devient instable sont définies par le ratio critique $(J/\tau_w)_{crit}$. Ce ratio représente le rapport entre le flux de matière convectif vers la membrane et le flux de rétrodiffusion de la membrane vers le *bulk* (il est en ce sens parfaitement assimilable au nombre adimensionnel de Péclet). Un résultat important de la thèse d'Anne Jimenez est d'avoir montré que les valeurs de $(J/\tau_w)_{crit}$ étaient liées à la quantité d'ions présents dans les laits écrémés (Fig.15B). Lorsque la force ionique est augmentée, $(J/\tau_w)_{crit}$ diminue indiquant que le gel se forme à des taux de cisaillement plus grands à même flux convectif. En d'autres termes, le gel se forme plus facilement et donc vraisemblablement à des concentrations en micelles de caséine plus faibles quand les laits sont dopés en ions. De plus les courbes de pression transmembranaire obtenues à différentes forces ioniques selon le principe de la Fig.15A indiquent clairement que la cohésion et l'irréversibilité des gels augmentent avec la force ionique. Le parallèle entre ces résultats et nos premières expériences de compression osmotique (partie 2.2.2, section (i)) était assez direct et évident. Les compressions osmotiques opérées à des forces ioniques élevées montrent que la transition sol-gel intervient en effet à des concentrations en caséines plus faibles (cf article A13). Les propriétés de cohésion des gels préparés par stress osmotique, telles que nous les avons discutées précédemment (Fig.9), sont également en parfaite adéquation avec les résultats de filtration à différentes forces ioniques. Avec les résultats de caractérisation *ex-situ* des dispersions denses de micelles de caséine, nous venons ainsi corroborer les hypothèses émises pour expliquer les résultats de filtration.

Dans le cadre de la thèse de Peng Qu que j'ai codirigée au STLO, nous avons continué d'étudier ces liens entre filtration et propriétés des dispersions de caséines mesurées hors filtration. Nous nous sommes limités au cas simple d'une filtration *frontale* de solutions modèles de micelles de caséine. Il s'agissait selon moi d'une étape obligée vers la compréhension et la modélisation de la filtration tangentielle du lait, mode évidemment privilégié dans l'industrie. En filtration frontale, il n'existe aucune recirculation ou agitation du fluide filtré côté retentât (Fig.16A). Les micelles de caséines s'accumulent à la surface membranaire et forment un gradient de concentration de la membrane vers le *bulk*. A ce gradient de concentration correspond un gradient de pression osmotique également représenté sur la Fig.16A. Lorsque la concentration en micelles de caséine dépasse une certaine concentration critique - et donc une pression osmotique critique Π_{crit} - il y a formation du gel à la membrane.

Selon une méthode mise au point par des collègues du LGC, il est possible de déterminer la valeur de Π_{crit} à partir d'une succession de filtrations frontales opérées à pression constante.⁷⁰ Dans une première étude sur laquelle je ne reviendrai pas en détails ici (article A19), nous avons montré que le

Π_{crit} ainsi obtenu été parfaitement comparable à la pression osmotique de transition sol-gel déterminée par compression osmotique. De manière tout à fait intéressante, on observe toutefois que la formation d'un gel irréversible se fait à une pression osmotique (et donc une concentration) légèrement plus élevée en filtration qu'en mode *statique* : 35 kPa contre 10 kPa. Cette différence pourrait s'expliquer par des effets cinétiques, la filtration étant conduite sur des temps plus courts que les compressions osmotiques, ce qui laisserait moins de temps aux connections intermicellaires pour s'établir correctement. La différence pourrait également être due au caractère fondamentalement hors équilibre de la filtration et à l'écoulement ininterrompu du fluide à travers les dépôts dans ce cas (contrairement au stress osmotique). Les forces hydrodynamiques générées par l'écoulement pourraient alors, d'une manière ou d'une autre, contribuer à une plus grande résistance de la dispersion vis à vis de la compression.

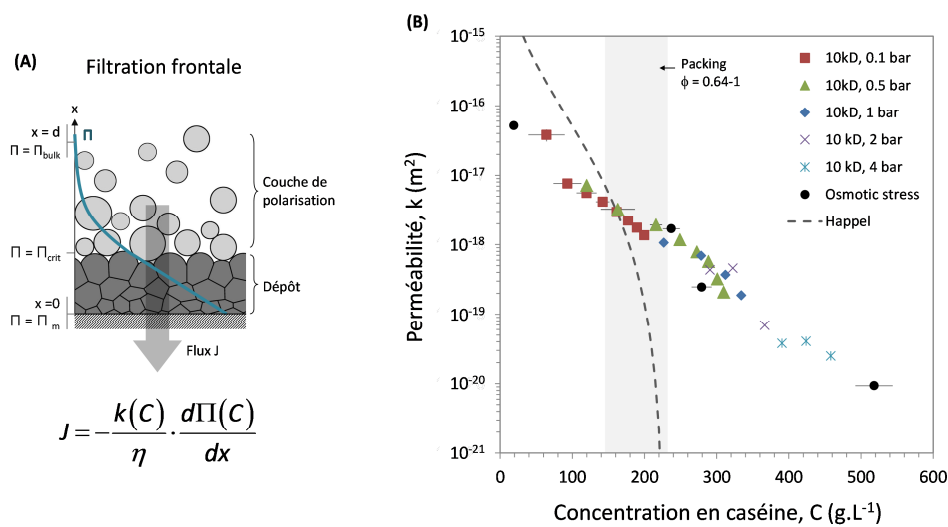


Fig.16. (A) Filtration frontale d'une solution colloïdale d'objets déformables et poreux. (B) Perméabilité des dispersions de micelles de caséine en fonction de la concentration.

Dans une seconde étude concernant la filtration frontale (article A11), nous avons porté notre attention sur la modélisation des phénomènes et sur l'établissement d'un outil prédictif des performances de l'opération. Nous nous sommes pour cela inspirés des approches de modélisation proposées par des chercheurs comme William Bowen, Menachem Elimelech, ou Patrice Bacchin.¹⁹⁻²¹ Ces approches ont été développées pour décrire la filtration frontale de colloïdes de type sphères dures. Dans ce cas la couche de colloïdes accumulés à la paroi de la membrane est décrite par un *classique* équilibre convection - diffusion. Toutefois il est nécessaire d'injecter dans le modèle un paramètre qui rende compte des interactions entre les colloïdes; ce paramètre étant bien sûr la pression osmotique de la dispersion. En suivant une démarche similaire, nous avons proposé que la filtration de toute espèce colloïdale, dure ou *molle*, pouvait in-fine répondre à l'équation donnée sur la Fig.16A ci-dessus. Cette équation permet de prédire le flux de filtration J moyennant la connaissance de deux paramètres essentiels : la pression osmotique Π , paramètre d'interactions, et la perméabilité k , paramètre qui rend compte de la résistance hydrodynamique à l'écoulement dans la structure de la dispersion ou du gel.

Les expériences de stress osmotique décrites dans la partie 2.2.2 nous avaient permis de déterminer expérimentalement la variation de la pression osmotique avec la concentration (Fig.7). Restait donc à déterminer la perméabilité k des dispersions de micelles de caséine pour pouvoir construire le modèle. Pour des solutions de sphères dures impénétrables, et moyennant la concentration et la taille des objets, la perméabilité k peut être estimée tout à fait directement à travers l'expression théorique de Happel.⁷¹ Dans le cas de la micelle de caséine, objet déformable, perméable et très polydisperse, aucun modèle théorique n'était et n'est encore capable d'estimer k . Il est cependant possible de mesurer ce paramètre expérimentalement et c'est ce que nous avons fait à travers deux approches distinctes : (i) le suivi cinétique d'expériences de stress osmotique, (ii) l'utilisation *reverse* de l'équation de la Fig.16 et le suivi de filtrations opérées à pression constante. Le résultat de ces mesures est donné dans la Fig.16B. Avant empilement compact des micelles dans les dispersions ($C < 150$ g/L), la perméabilité est assurée par les vides intermicellaires. Assez logiquement, les valeurs atteintes sont alors comparables à ce que prévoit le modèle de Happel pour des dispersions de sphères dures de tailles identiques (trait pointillé). La perméabilité mesurée est cependant systématiquement inférieure au modèle de Happel dans cette gamme de concentration. On ne peut expliquer ceci par le caractère poreux des objets, les dispersions d'objets de ce type ayant toujours des perméabilités supérieures à celles de dispersions de sphères non poreuses de même taille.⁷² Nous attribuons donc cette différence à la présence de fragments de micelles et de caséines dans les espaces intermicellaires; fragments qui influent également sur la pression osmotique des dispersions (cf Fig.7). Après empilement compact des micelles et formation d'un gel ($C > 150$ g/L), la perméabilité est cette fois essentiellement assurée par la porosité interne de la micelle. Elle est de fait supérieure à ce que prévoit Happel pour des sphères dures, et elle diminue régulièrement avec la concentration à mesure que le gel se comprime et que les vides intramicellaires s'effacent.

En utilisant les évolutions mesurées de Π et k en fonction de la concentration en caséine, nous avons construit le modèle permettant de décrire et prédire la filtration. Un exemple d'utilisation de ce modèle est donné dans la figure suivante (Fig.17). Il s'agit ici des calculs obtenus pour une filtration *virtuelle* opérée à une pression transmembranaire ΔP de 1 bar.

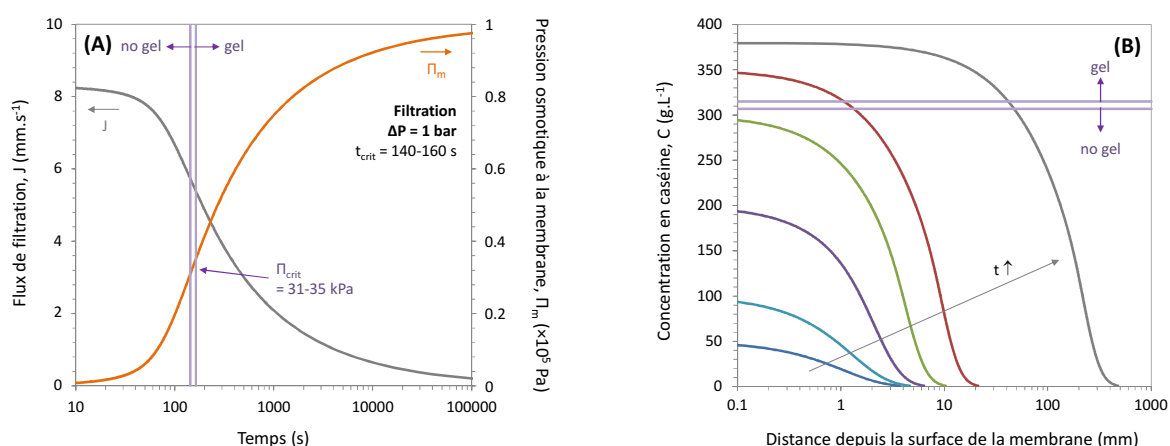


Fig.17. Modélisation de la filtration frontale de dispersions de micelles de caséine à $\Delta P = 1$ bar. (A) Evolution du flux et de la pression osmotique à la membrane en fonction du temps. (B) Evolution du gradient de concentration en caséine à la surface de la membrane en fonction du temps (6 s, 14 s, 43 s, 128 s, 456 s, 2.3 j).

La première *sortie* du modèle est bien sûr l'évolution du flux de perméation J avec le temps (Fig.17A), information qui intéresse directement l'utilisateur de la filtration. Le modèle permet également de calculer l'évolution de la pression osmotique à la surface de la membrane en fonction du temps (Fig.17A). Il s'agit là d'une information particulièrement intéressante pour l'utilisateur. En effet, lorsque cette pression dépasse la valeur critique Π_{crit} que nous avons déterminée par ailleurs (article A19), le gel de micelle de caséine commence à se former à la membrane, marquant ainsi le début du colmatage irréversible de l'installation. Le modèle permet ainsi de déterminer le temps critique de filtration à partir duquel il y a passage vers un colmatage irréversible (entre 100 et 200 s pour l'exemple de la Fig.17A). Sur la Fig.17B sont portées les valeurs calculées par le modèle des concentrations en caséine dans la couche de polarisation à différents temps de filtration. Ces calculs permettent d'estimer l'épaisseur de la couche colmatante en fonction du temps, autre information importante pour l'opérateur.

Les perspectives de ces travaux de modélisation sont de deux ordres. Le premier aspect concerne l'adaptation du modèle à la filtration du lait en mode tangentiel, ce qui semble tout à fait possible moyennant une étude fine des phénomènes de rétrodiffusion hydrodynamiques à la membrane. Ce travail est actuellement en cours au STLO dans le cadre de la thèse de Floriane Doudiès dirigée par Geneviève Gésan-Guiziou et débutée en septembre 2016 (je ne suis pas partie prenante de ce travail mais vais participer au comité de suivi de la thèse). Le second aspect, qui me semble réellement capital, concerne la modélisation de la sélectivité de la filtration et donc de la transmission des protéines solubles en fonction des paramètres opératoires. Le problème est compliqué et nécessite à mon sens plusieurs années de travail. Je n'ai pas discuté récemment des orientations de recherche en ce sens au STLO. Mais il ne fait aucun doute que les données de structure, de porosité et de diffusivité qui sont présentées dans la section 2.2.2 pourront aider à l'établissement d'un tel modèle à l'avenir.

2.3 Structure de la micelle de caséine

Articles AI8 et AI13

Comme expliqué précédemment, la question de la structure de la micelle est un sujet que j'ai abordé relativement fortuitement à travers des expériences SAXS sur des dispersions concentrées de micelles de caséine (Fig.11). L'arrivée du microscope AFM au STLO a été pour moi une première occasion de revenir sur cette question. Un avantage majeur de la technique AFM est de pouvoir prendre des images topographiques d'un objet en milieu liquide, à la seule condition de l'avoir préalablement immobilisé sur une surface. A l'inverse des techniques de microscopie optique ou électronique, il semblait donc possible de visualiser par AFM la micelle de caséine dans son état natif et son environnement aqueux naturel.^{73,74} Ma collègue Fanny Guyomarc'h est moi-même nous sommes attelés à cette tâche avec l'aide précieuse de Mustapha Ouanezar alors étudiant M2 au STLO.

La Fig.18A est un exemple d'image AFM obtenue en milieu aqueux au pH et à la composition ionique du lait. Les micelles sont immobilisées sur une surface d'or via une chimie EDC/NHS. Elles se déforment légèrement lors de cette immobilisation mais leur volume n'en est pas affecté. On peut donc raisonnablement considérer que c'est une micelle de caséine quasi *intacte* que montre cette image. La surface externe de la micelle apparaît comme particulièrement rugueuse et hétérogène. Notre hypothèse est que ces irrégularités de surface sont le reflet des hétérogénéités internes de la micelle de caséine telles que nous les avons mises en évidence par SAXS (le modèle *éponge*...). Les échelles de taille des hétérogénéités de surface (AFM) et de volume (SAXS) sont d'ailleurs parfaitement compatibles, entre 10 et 50 nm.

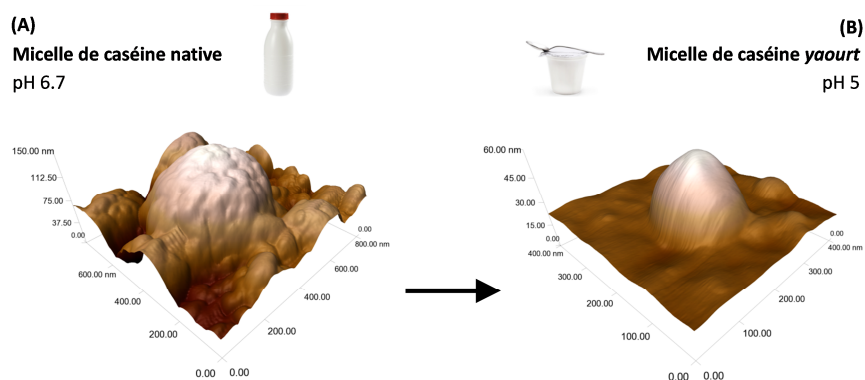


Fig.18. Images AFM d'une micelle de caséine dans son environnement natif (pH 6.7) et après acidification (pH 5).

La Fig.18B est une image AFM de la micelle de caséine après acidification de son environnement aqueux à pH 5. A ce pH, les micelles d'un lait sont agrégées les unes aux autres et forment un gel de type *yaourt*. La Fig.18B est en quelque sorte l'image d'une brique élémentaire constituant ce type de gel. On y voit une micelle beaucoup plus petite, plus ramassée, et également beaucoup plus lisse en surface que dans son état natif. La perte de volume, estimée à 50-75% du volume initial, s'explique par une neutralisation quasi totale des charges des caséines ($pI \approx 4.6$) et un processus d'agrégation et

de gélification interne à la micelle. Des résultats SAXS de collègues de l'université de Lund suggèrent par ailleurs que cette compaction de la micelle s'accompagne d'une perte des hétérogénéités de sa structure interne.³⁶ L'aspect lisse observé par AFM serait donc le résultat, en surface, de cette meilleure homogénéité interne de l'objet à pH 5.

C'est à travers des expériences SANS de variation de contraste que j'ai continué de travailler sur la structure interne de la micelle. L'idée de ces expériences revient à Bernard Cabane et à son souvenir des travaux historiques d'Heinrich B. Stuhrmann concernant les hétérogénéités de structure et de composition de la ferritine et d'autres protéines.^{75,76} La variation de contraste en SANS repose sur le fait que les neutrons interagissent très différemment avec les atomes d'hydrogène H et de deutérium D. En substituant D à H à des degrés variables dans un échantillon aqueux, il est ainsi possible de moduler distinctement les interactions des neutrons avec le solvant, les particules qui y sont dispersées, et les différents constituants des particules. La façon dont le spectre SANS évolue avec ce changement de *contraste* renseigne alors directement sur la composition et la structure des particules. H.B. Stuhrmann propose de se concentrer sur la partie du spectre de diffusion enregistrée aux petits vecteurs d'onde q . Dans cette zone, le signal SANS est traité selon l'approximation de Guinier et donne accès au rayon de giration de la particule R_g et à l'intensité diffusée à angle nul I_0 . Je ne reviens pas ici sur l'interprétation de la variation de I_0 avec le contraste, qui n'est pas directement intéressante dans le cas de la micelle de caséine. L'évolution du R_g avec le contraste donne quant à elle accès à la variation radiale de composition interne des particules. Pour des particules exemptes de telles variations de composition interne, R_g n'évolue pas avec le contraste. Pour des objets de type cœur-couronne, Stuhrmann a démontré que $(R_g)^2$ évolue linéairement avec l'inverse du contraste moyen des particules $1/\rho$ (Fig.19A).

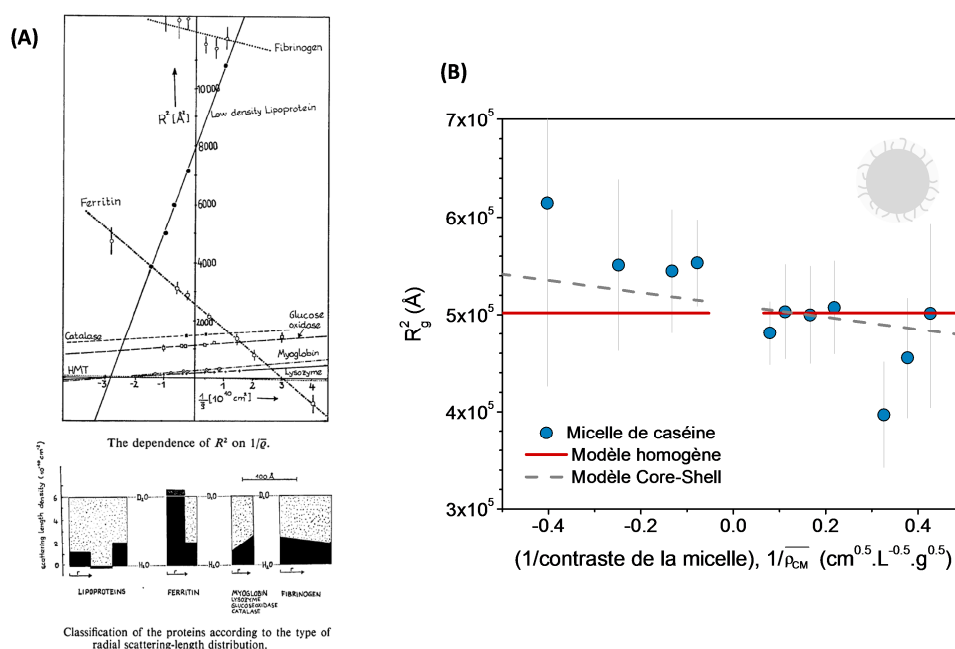


Fig.19. (A) Principe de l'analyse de Stuhrmann d'une expérience de variation de contraste SANS. Le rayon de giration R_g d'une particule présentant une variation radiale de composition évolue avec le contraste moyen de la particule $\bar{\rho}$ selon une loi linéaire $(R_g)^2 = f(1/\bar{\rho})$. (B) Analyse de Stuhrmann pour la micelle de caséine.

Dans le cas de la micelle de caséine, la méthode de Stuhrmann paraissait particulièrement appropriée pour examiner comment les nanoclusters de CaP sont distribués dans l'édifice micellaire, question soulevée par différents auteurs à l'époque.^{57,77} La variation du rayon de giration de la micelle en fonction de son contraste est portée sur la Fig.19B. Nous trouvons que cette variation est en faveur d'une micelle cœur-couronne du point de vue de la distribution en nanoclusters CaP, avec une diminution nette de $(R_g)^2$ avec $1/\rho$. Le fait que nous observons une diminution de $(R_g)^2$ plutôt qu'une augmentation indique que la couronne est moins dense que le cœur. La variation expérimentale est alors proche de ce qu'un modèle prévoit pour un objet de distribution radiale uniforme en CaP dans le cœur, et dont la couronne est exempte de CaP et constituée uniquement de brins de caséine κ (modèle Core-Shell, Fig.19B). Ces résultats viennent ainsi confirmer la présence d'une brosse à la surface de la micelle et en préciser la composition. Ils sont également en accord avec une structure interne de type *éponge* formée par agrégation aléatoire de sous-unités caséique denses et contenant les nanoclusters de CaP.

Suite à ce travail, Bernard Cabane m'a proposé récemment de participer à une étude similaire de variation de contraste SANS sur un système constitué de vésicules lipidiques et d'une protéine impliquée dans la maladie de Parkinson, l' α -synucléine. L'objectif est de caractériser les interactions lipides-protéines et de déterminer en quoi ces interactions sont responsables de la dénaturation de l' α -synucléine et de la formation de fibrilles amyloïdes. Il s'agit d'un travail en collaboration avec Emma Spaar et Sarah Linse de l'université de Lund.⁷⁸ Une première série d'expériences a été réalisée fin 2016. Les résultats obtenus sont en cours d'analyse.

2.4 Interactions et structuration aux fortes concentrations

Je décris ici brièvement les travaux que j'ai démarrés en parallèle de mon activité principale de recherche sur la micelle de caséine. Ils sont dans tous les cas liés à cette thématique, soit à travers les approches et techniques expérimentales utilisées, soit à travers les questions génériques abordées. Il s'agit pour la plupart de travaux en cours qui ne sont pas encore complètement finalisés et valorisés. Je ne les considère pas pour autant comme faisant partie de mes perspectives de recherches puisqu'ils ne concernent pas la thématique qui m'occupe à présent au LISBP (partie 3).

2.4.1 Protéines globulaires (en cours)

Article AI15

Les phénomènes d'interactions et de structuration dans les solutions denses de protéines intéressent au premier chef des collègues du STLO et de l'IPR de Rennes - Stéphane Pézenec et Sylvie Beaufile - pour leur lien potentiel avec le comportement des protéines à l'interface eau-air (cf description de la thèse de Coralie Pasquier, partie 1.3). Les protéines modèles sont des protéines du lait ou de l'œuf : lysozyme, ovalbumine, α -lactalbumine, utilisées dans l'industrie pour leurs propriétés moussantes notamment. Nous avons étudié le comportement de ces protéines par des approches tout à fait similaires à celles utilisées pour caractériser les systèmes de micelles de caséine aux fortes concentrations.

Nous avons récemment publié les résultats concernant le lysozyme, petite protéine globulaire de 14 kDa et ~ 3 nm de diamètre. Cette protéine est très bien caractérisée du point de vue biochimique mais son comportement aux fortes concentrations est assez peu documenté. Seules quelques études - parfois contradictoires - traitent de ses propriétés de *self-interaction* dans ces conditions, mais dans une gamme de concentration qui reste limitée aux fractions volumiques < 0.2 - 0.3 .^{27,79,80} Dans notre étude, nous avons utilisé les techniques de compression osmotique et de sorption dynamique pour mesurer la pression osmotique de solutions de lysozyme - et donc les interactions entre objets - dans une gamme de concentration la plus large possible. Quelques-uns des résultats obtenus sont donnés sur la Fig.20.

Comme pour la micelle de caséine, l'évolution de la pression avec la concentration peut se décrire suivant trois régimes de compression. Mais la comparaison s'arrête ici puisque les mécanismes mis en jeu sont très différents dans le cas du lysozyme. Dans le régime dilué, la pression mesurée est légèrement supérieure à celle attendue pour des particules ponctuelles n'interagissant pas entre elles (van't Hoff), ou des sphères dures interagissant par des effets de volume exclu (Carnahan-Starling). Compte tenu de l'absence d'impuretés peptidiques dans les solutions, cette différence ne peut s'expliquer que par des effets de répulsion électrostatique forte entre protéines. Un calcul théorique de la pression osmotique à partir de la charge de surface du lysozyme et de la force ionique de la solution nous a permis de confirmer cette hypothèse (cf article AI15).

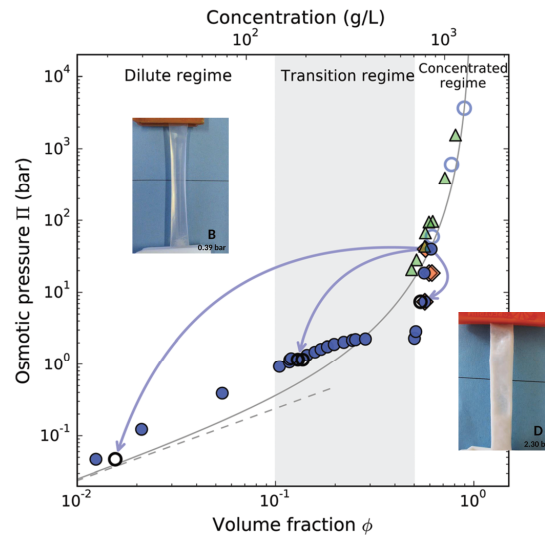


Fig.20. Evolution de la pression osmotique de solutions de lysozyme avec la concentration; pH 7 et force ionique 20 mM. Ligne pointillée : équation de Van't Hoff. Ligne continue : équation de Carnahan-Starling pour une solution de sphères dures. Les flèches indiquent les chemins choisis pour les expériences de *décompression* osmotique.

Dans le second régime de concentration, l'évolution de la pression osmotique avec la concentration devient très surprenante. L'augmentation est de moins en moins marquée et un plateau de pression osmotique est atteint en fin de régime. En conséquence la pression osmotique reste quasiment stable à $\Pi \approx 2$ bar pour des fractions volumiques comprise entre 0.2 et 0.5 (!). Il s'agit en fait ici de la signature d'une transition de phase liquide-solide, et plus particulièrement de la cristallisation du lysozyme. En effet des agrégats blanchâtres apparaissent peu à peu dans les sacs de dialyse et des spectres SAXS obtenus par ailleurs montrent la présence effective de cristaux dans les solutions.

Enfin à partir d'une fraction volumique de 0.5, la pression osmotique augmente à nouveau et de façon très rapide avec la concentration. Dans ce cas toutes les protéines ont cristallisé et la pression osmotique est une mesure de la résistance à la compression de l'empilement des cristaux dans la solution.

De façon tout à fait importante, nous trouvons que la compression est parfaitement réversible : lorsqu'une solution initialement fortement comprimée et entièrement cristallisée est *décomprimée* à une pression osmotique plus faible, elle revient à une concentration identique à celle atteinte par compression directe. Autrement dit, la position des points de la courbe $\Pi=f(\phi)$ ne dépend pas du chemin utilisé pour les atteindre. Tous ces points sont donc des points d'équilibre thermodynamique. La courbe de la Fig.20 est alors assimilable à une *équation d'état* du lysozyme dans les conditions physico-chimiques utilisées. Une partie de l'article que nous consacrons au lysozyme est dédiée à l'évolution de cette équation d'état en fonction de la charge de l'objet (variation de pH) et de l'écrantage de cette charge (force ionique).

Les résultats concernant l'ovalbumine, la mesure de ses interactions par stress osmotique, et la structure SAXS des solutions comprimées, font l'objet d'un article en cours de préparation (article AP4). Sans rentrer dans les détails ici, nous trouvons que le comportement de cette protéine est très

différent de celui du lysozyme pour une charge nette qui est cependant similaire à pH 7 ($Z/e = -9.5$ et 8.3 pour l'ovalbumine et le lysozyme, respectivement). En particulier, aucune cristallisation n'est observée pour l'ovalbumine, sa pression osmotique augmente régulièrement avec la concentration, et Π est très peu sensible à la force ionique du solvant. Ces différences de comportement pourraient résulter d'effets d'interactions spécifiques entre les protéines et les cations et anions minéraux présents dans les solutions; interactions de natures supposément très différentes quand la protéine est chargée négativement ou positivement. De manière tout à fait intéressante, on retrouve ce comportement différencié de l'ovalbumine et du lysozyme lorsqu'on s'intéresse à la façon dont les deux protéines s'accumulent à l'interface eau-air. Un article est en préparation sur ce point (article AP3). Il se fonde sur des expériences de réflectivité de neutrons auxquelles j'ai participé avec mes collègues rennais.

2.4.2 Microgels (en cours)

Le comportement d'objets *déformables*, *compressibles* et *perméables* en filtration est une question particulièrement intéressante. Elle dépasse de loin le seul cas de la micelle de caséine et concerne de nombreux autres objets *mous* manipulés dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, ou du traitement de l'eau : constructions protéiques diverses, objets biologiques, flocs... Cependant cette question a été peu abordée jusqu'à présent et elle commence seulement maintenant à intéresser les chercheurs des communautés *soft matter* et du génie des procédés.^{49,81-83}

Les microgels sont un modèle idéal pour des recherches génériques sur le comportement des objets mous et poreux en filtration : ils sont facilement synthétisables et leur taille et propriétés élastiques peuvent être modulées à façon. A mon passage au LGC de 2011-2013, j'ai réalisé une première étude visant à suivre la filtration de ce type d'objet (stage de Florian Lange, 2012). J'ai choisi d'utiliser des microgels de dexMa, dextran modifié par adjonction de fonctions méthacrylate, synthétisés par un processus d'émulsification-polymérisation.^{84,85} Les microgels de ce type ont des tailles comprises entre 10 et $50\ \mu\text{m}$ (Fig.21A), et c'était là un critère essentiel dans mon cas. En effet l'idée était de suivre la filtration de dispersions de ces objets par microscopie optique dans les dispositifs de filtration spécifiques représentés sur la Fig.21B. Ces dispositifs ou *micro-séparateurs* étaient de fait disponibles au LGC car développés et utilisés depuis quelques temps par les chercheurs de ce laboratoire pour étudier la filtration de particules de latex par exemple.^{86,87} Ces micro-séparateurs sont réalisés en PDMS. La partie filtrante consiste en un alignement de canaux droits de section rectangulaire $50 \times 5\ \mu\text{m}$ de sorte à ce que les microgels soient tous parfaitement retenus par la *membrane*. Les résultats de cette première étude expérimentale ont été plutôt intéressants. Nous avons par exemple mis évidence des phénomènes de compaction/relaxation du dépôt en fonction des paramètres opératoires. Nous avons également observé qu'il existe une pression de filtration critique à partir de laquelle les microgels sont poussés à travers les pores par des effets de déformation et de compression individuelle des objets.

Forts de ces premières observations, Martine Meireles du LGC et moi-même avons décidé de continuer de travailler sur ces questions avec la thèse d'Isabella de Aguiar débutée en octobre 2013 et qui s'achèvera fin 2017 (cf partie 1.3). Pour ce travail, notre choix a été de regarder au plus près comment les microgels s'organisent et réagissent collectivement à la compression par des approches

à la fois de filtration et de compression par centrifugation et stress osmotique. Je ne présente pas ici les travaux les moins aboutis et encore en cours qui concernent les aspects filtration et centrifugation. Pour une présentation des dispositifs expérimentaux dans ces deux cas, je renvoie cependant à la lecture de deux articles des collègues néerlandais avec qui nous travaillons : van de Laar et al,⁸⁸ Krebs et al.⁸⁹

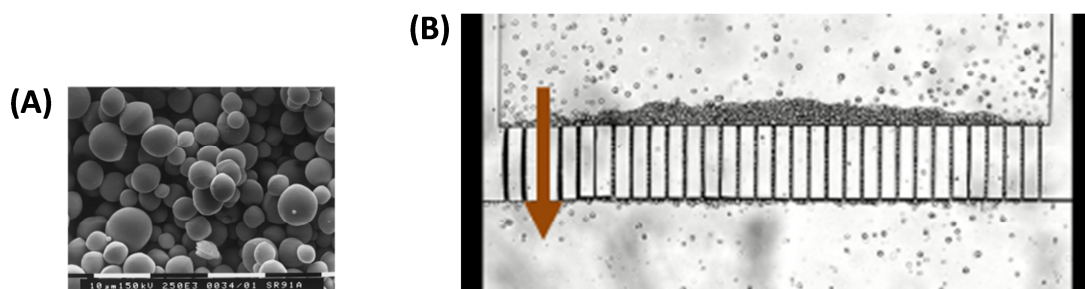


Fig.21. (A) Cliché MEB de particules de microgels de dextran *dexMA* (barre blanche = 10 µm).⁸⁴ (B) Accumulation de microgels de 10 µm à l'entrée de canaux de 5 µm lors d'une filtration sur microséparateur.

La figure suivante est un aperçu des résultats que nous devrions soumettre pour publication dans les prochains mois (article AP1). L'objectif est ici de caractériser la résistance à la déformation d'un empilement de microgels et de comprendre dans quelles mesures cette résistance est liée à la structure de l'empilement et aux propriétés intrinsèques des microgels. Pour cela nous avons mesuré la pression osmotique de dispersions de microgels de dextran à différents degrés de compression (Fig.22). Nous avons parallèlement acquis des images en microscopie confocale de ces dispersions, comme illustré sur cette même figure. Avec de telles images, il est possible de quantifier le degré de déformation et de compression des microgels dans les dispersions.

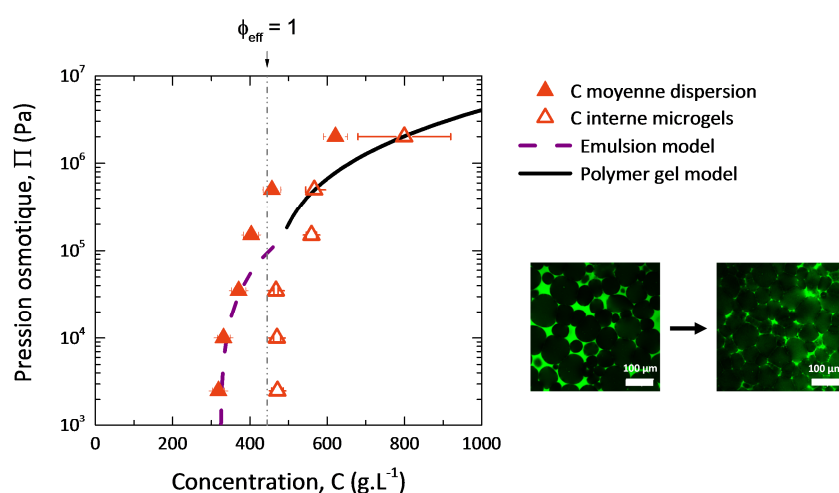


Fig.22. Evolution de la pression osmotique d'un empilement de particules d'un microgel de dexMA en fonction de la concentration en polymère. Exemple d'images de microscopie confocale des empilements.

Les microgels étant de tailles microniques, ils sédimentent et tombent au fond des sacs de dialyse avant compression ($\Pi = 0$). Par conséquent dès les pressions les plus faibles, les microgels sont au contact et empilés les uns sur les autres (cf première image confocal). En début de compression, au niveau des 2-3 premiers points de pression osmotique, nos résultats de microscopie indiquent que les microgels se déforment mais ne se *dégonflent* pas ou très peu. Dans ce régime de compression, l'empilement de microgels se comporterait donc comme une dispersion concentrée de gouttelettes d'émulsions vis à vis d'une augmentation de la concentration : les objets se déforment les uns contre les autres sans perdre de volume. Un modèle de pression osmotique élaboré pour des émulsions est en effet capable de décrire l'évolution de la pression dans ce régime (courbe pointillée mauve). Ce modèle permet de relier la pression osmotique à la fraction volumique en microgels dans l'empilement, et donc la concentration moyenne en polymère dans le système (triangles pleins). A des concentrations supérieures, le même modèle n'est plus capable de décrire l'évolution de la pression, suggérant que les microgels répondent à la compression par un autre mécanisme que la déformation. Les images de microscopie montrent effectivement que les microgels perdent cette fois-ci de leur volume interne à la compression. Dans ce cas un modèle qui vient à l'esprit est celui proposé par Menut et Weitz pour des empilements très denses de microgels (courbe noire).⁴⁹ La pression osmotique ne dépend alors plus de la concentration moyenne en polymère dans la dispersion, mais directement de la concentration en polymère à l'intérieur des particules de microgel (triangles vides).

3 Perspectives de recherche

Catching enzymes in action: Soft matter approaches to enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass

Je ne traite dans cette partie que des activités de recherche en lien avec ma nouvelle thématique au LISBP, à savoir la dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique. Le sous-titre choisi, en langue anglaise, est celui d'un projet JCJC que j'ai soumis à l'ANR en octobre 2016. Le projet n'a pas été retenu mais son intitulé résume assez simplement la problématique et les approches que je présente dans la suite. Voici un peu plus de trois ans que j'ai entamé ce virage vers une nouvelle thématique, temps pendant lequel mes réflexions et intentions ont peu à peu muries et gagnées en assurance. Pendant cette période, j'ai obtenu de premiers résultats intéressants, qui, s'ils ne sont pas encore vraiment valorisables, viennent conforter les orientations que j'ai choisi de prendre pour cette nouvelle étape dans mon parcours de chercheur.

3.1 Contexte et questions

LISBP et équipe d'accueil

Le LISBP, laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés est une UMR INRA-CNRS-INSA implantée sur le campus de l'INSA de Toulouse. Environ 340 personnes y travaillent dont ~80 chercheurs et enseignants-chercheurs, ~115 ingénieurs, techniciens et administratifs, et ~100 doctorants et post-doctorants. Les recherches menées au LISBP se veulent à l'interface entre les sciences du vivant et les sciences des procédés, avec des applications variées dans les secteurs de la santé, des biotechnologies, de l'environnement, des agro-industries et de la chimie. A l'heure actuelle, 12 équipes de recherche composent le LISBP (http://www.lisbp.fr/fr/la_recherche.html). Dans les prochains mois (le laboratoire est en cours de restructuration), ces équipes seront réparties dans les 5 départements de recherche suivants : 1. Catalyse et ingénierie enzymatique, 2. Ingénierie métabolique, 3. Physiologie bactérienne, 4. Ingénierie microbiologique, 5. Génie des (bio-)procédés. A la différence du STLO, le LISBP ne se distingue pas par un ou des *objet(s)* en particulier (l'œuf, le lait...). Les agents INRA travaillent donc sur des objets variés (protéines, enzymes, bactéries), mais bien sûr toujours en lien avec des problématiques ciblées et à visées finalisées. Une des particularités du laboratoire est peut-être également la structure TWB (Toulouse white biotechnology), UMS INRA-CNRS-INSA et démonstrateur pré-industriel qui vient s'adosser au LISBP et qui - entre autres choses - facilite les échanges entre les partenaires industriels membre de TWB (Total, L'Oréal, Michelin, Roquette...) et les chercheurs du LISBP.

J'appartiens à l'équipe TIM (transfert, interface, mélange) du LISBP; équipe qui rejoindra le futur département *génie des (bio-)procédés* du laboratoire. Les scientifiques de TIM sont très majoritairement des enseignants-chercheurs de l'INSA (10 au total). Mickaël Castelain, CR dans l'équipe depuis 2014, et moi-même sommes les deux seuls agents INRA de l'équipe. L'équipe TIM revendique une approche générique des questions du génie des procédés, avec des activités de recherches sur systèmes modèles et visant à découpler et comprendre les mécanismes qui régissent un procédé quel qu'il soit. L'équipe est structurée en deux axes de recherches :

(i) un axe qui vise principalement à comprendre et simuler les phénomènes de transfert et l'hydrodynamique dans des écoulements spécifiques (e.g. conduites pétrolières) et des procédés de type échangeurs gaz-liquide ou bioréacteurs de fermentation. Les échelles abordées sont plutôt macroscopiques, et les approches à la fois expérimentales et de simulation numérique : mécanique des fluides, modèles à bilans de population.

(ii) un axe qui vise à caractériser et élucider, aux échelles micro- et mésoscopiques, les mécanismes élémentaires d'interactions et de réactivité mis en œuvre dans des opérations variées de type filtration, flottation, et... dégradation enzymatique. Les approches suivies sont essentiellement expérimentales, avec bien sûr une volonté de modéliser les phénomènes mis en jeu. Les compétences relèvent ici moins du génie des procédés que de la physico-chimie ou de la (bio-)physique.

Mes recherches se positionnent dans le deuxième axe de recherche de TIM et concernent la dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique (cf partie suivante). J'ai choisi d'aborder cette thématique à travers une approche similaire à celle que j'ai développée au STLO qui se fonde sur une caractérisation *physique* des processus, aux petites échelles et sur des systèmes modèles (section 3.2). L'idée est assez nouvelle au LISBP, et mon - modeste - objectif est d'apporter par ce moyen une vision inédite des processus catalytiques, au niveau du laboratoire et au-delà. Je ne travaille pour autant pas complètement isolément sur ces approches au LISBP et collabore étroitement sur le sujet avec deux chercheurs INRA de l'équipe (et bientôt département) *catalyse et ingénierie enzymatique*, Cédric Montanier et Claire Dumon.

Déconstruction enzymatique de la biomasse lignocellulosique

Le contexte global est la valorisation de la biomasse lignocellulosique (= paroi des cellules végétales, résidus de l'agriculture) en énergie ou composés intermédiaires à haute valeur ajoutée (Fig.23).^{90,91} Un des objectifs de l'INRA est de contribuer à la maîtrise et l'optimisation des procédés mis en œuvre pour cette valorisation.

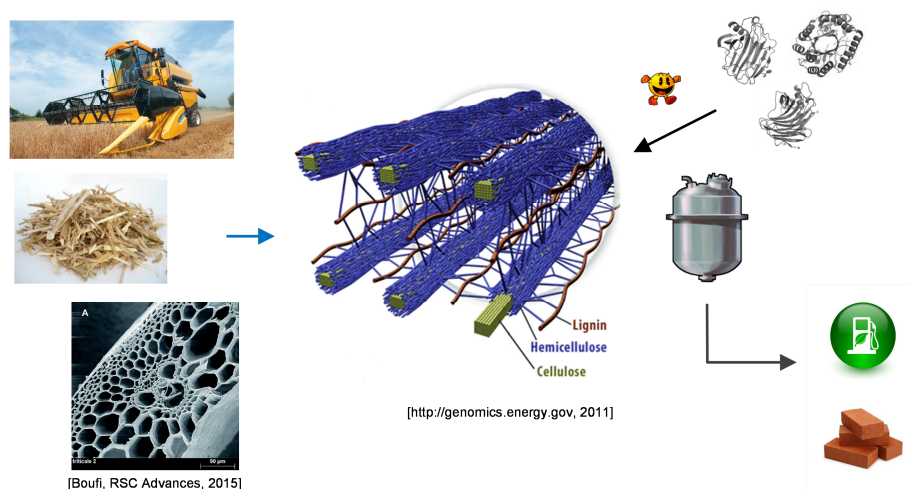


Fig.23. Valorisation de la biomasse lignocellulosique par des procédés centrés sur une déconstruction enzymatique du matériau.

La biomasse lignocellulosique est constituée de différentes *couches*, elles-mêmes de composition et structure hétérogènes (Fig.23). Pour faire bref, la paroi végétale primaire est composée de celluloses et d'hémicelluloses, imbriquées les unes dans les autres. La paroi secondaire est quant à elle principalement constituée de lignine, polymère aromatique. De par sa composition et sa structure, la biomasse est naturellement très résistante à sa déconstruction; que ce soit par voie chimique ou enzymatique. C'est ce qu'on appelle la *récalcitrance* de la biomasse.^{92,93} La déconstruction de la biomasse par des enzymes est un processus naturel, que l'on exploite à l'échelle industrielle pour obtenir des sucres élémentaires (convertis in-fine en biocarburant dit de deuxième génération comme le bioéthanol), ou, éventuellement, en autres produits élémentaires pour la production de bioplastiques par exemple.

In-vivo, les bactéries ou champignons synthétisent un mélange complexe de différents enzymes pour parvenir à dégrader le matériau lignocellulosique. Ces enzymes, spécifiques de tel ou tel composant, vont agir en synergie pour que la déconstruction soit optimale. Il y a deux stratégies : (i) les enzymes sont secrétées par les micro-organismes, et vont donc attaquer le matériau de manière indépendante et *libre*, (ii) les enzymes restent accrochées à la surface des bactéries, sur une sorte d'*échafaudage* (le cellulosome) qui regroupe des enzymes de différentes natures.⁹⁴ Dans tous les cas, l'attaque in-vivo ne se fait pas en solution, mais au sein du fruit qui *pourrit*, à proximité d'un champignon qui attaque l'écorce d'un arbre, ou encore dans les composteurs de nos jardins. Il est difficile d'estimer la concentration en eau dans de telles situations, mais elle est probablement suffisante pour assurer la mobilité des enzymes et/ou des bactéries. Toujours in-vivo, il s'agit donc pour l'enzyme, ou la bactérie recouverte d'enzymes, de se frayer un chemin au sein de la structure tout en la déconstruisant. In-vivo, on peut donc parler d'une dégradation dans un milieu hétérogène et qui a lieu principalement à des interfaces liquide-solide.

Dans l'industrie, le procédé utilise également des cocktails d'enzymes mis en œuvre dans des conditions permettant aux enzymes de pénétrer au mieux dans les structures pour les dégrader. Le substrat réel est un substrat insoluble et particulaire : broyats de paille de blé ou autres résidus d'exploitations forestières ou agricoles. Il est dégradé en milieu aqueux dans des bioréacteurs fonctionnant à des concentrations de l'ordre de 10-20% en matière sèche. La réaction est soit directe - le cocktail enzymatique est ajouté à la solution - soit médiée par un consortium microbien qui lui-même produit les enzymes de dégradation. Là aussi nous pouvons parler de réactions catalytiques en milieu hétérogène, qui ont lieu aux interfaces liquide-solide ou dans des conditions de concentration probablement très élevées quand les enzymes pénètrent le matériau pour le dégrader.

Il existe encore peu de procédés permettant d'obtenir du bioéthanol de deuxième génération par voie enzymatique (voir le projet futurol par exemple : <http://www.projetfuturol.com/>). Dans ce cas, seule la partie cellulosique de la plante est utilisée. Le procédé consiste à séparer mécaniquement et chimiquement la cellulose de l'hémicellulose et de la lignine, puis (ou de façon concomitante) de soumettre l'extrait cellulosique à des cocktails enzymatiques visant à continuer cette séparation et à aller jusqu'au glucose. L'opération finale vise à transformer le glucose en éthanol par fermentation. L'un des challenges pour ce type de procédé est d'optimiser les cocktails enzymatiques de façon à en utiliser moins et à ce qu'ils soient les plus efficaces possibles.

Le second challenge industriel consiste à aller plus loin dans la valorisation de la plante et de parvenir à dégrader tout aussi complètement la lignine et l'hémicellulose. Concernant l'hémicellulose, la voie enzymatique est parfaitement envisageable,⁹⁵ mais les exemples industriels sont encore peu nombreux, toujours pour des raisons d'optimisation du procédé et de coût des opérations (production des enzymes notamment).

Questions spécifiques

Parmi les voies d'investigation actuelles pour l'amélioration des procédés, on trouve (a) le développement de nouvelles techniques de prétraitement (chimiques, mécaniques) avant l'étape de déconstruction enzymatique,⁹⁶ (b) la découverte de nouvelles enzymes plus efficaces,^{97,98} (c) une meilleure identification de la façon dont les enzymes dégradent leur substrat, (d) la compréhension des relations entre la structure des enzymes et leurs fonctions enzymatiques. Je me place quant à moi dans le cadre des points (c) et (d), et m'intéresse donc au déroulement et à l'efficacité de l'action enzymatique, ainsi qu'aux déterminants structuraux de cette action enzymatique.

Les communautés des biologistes et des biochimistes sont bien entendu les premières à s'être intéressées à ces problématiques; les recherches visant à caractériser le fonctionnement des enzymes d'un point de vue moléculaire (quels acides aminés sont mis en jeu ? quelles conditions optimales de pH et de température ?),⁹⁹ et à établir des classifications permettant d'appréhender leur diversité biologique.¹⁰⁰ A l'heure actuelle, la problématique de la dégradation enzymatique de la biomasse est encore principalement abordée de ce point de vue, avec donc un accent mis sur l'enzyme en tant que tel et sa caractérisation *biochimique*. Or classiquement, cette caractérisation est menée dans des conditions d'hydrolyse très particulières, c'est à dire vis à vis d'un substrat soluble et en solution diluée.^{101,102} Nous sommes donc ici très loin des conditions industrielles d'hydrolyse. Une première série de questions concerne donc le déroulement de l'action enzymatique dans des situations *réelles* de fonctionnement (point (c)). Comme déjà évoqué, un aspect fondamental de cette réalité est que les enzymes sont confrontées à un substrat majoritairement insoluble et particulaire, et sont donc ainsi contraintes de travailler à l'interface entre le substrat et la solution où elles sont dispersées et/ou dans des conditions locales de très fortes concentrations et donc de grand confinement spatial (Fig.24A). Un autre aspect important est la complexité de composition du substrat et des interactions entre ses différents composés (cellulose-hémicellulose, lignine-cellulose, etc.). Les enzymes doivent nécessairement composer avec cette complexité et ces interactions pour dégrader complètement le matériau.

Concernant les relations structure-fonction des enzymes (point (d)), les questions sont essentiellement liées au caractère multi-modulaire des enzymes lignocellulolytiques. En effet, de nombreuses enzymes ont évoluées vers des structures modulaires qui présentent, en plus d'un module catalytique, un ou plusieurs module(s) non-catalytiques appelés CBM (carbohydre binding module).¹⁰³ Les CBM ont une affinité forte pour un ou plusieurs des composés de la lignocellulose. Ils viennent ainsi aider l'enzyme à *trouver* son substrat et à le dégrader plus rapidement; notamment lorsqu'il s'agit d'un substrat insoluble et complexe (Fig.24B). Pour autant, les mécanismes d'action de ces CBM ne sont pas encore connus avec précision.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷

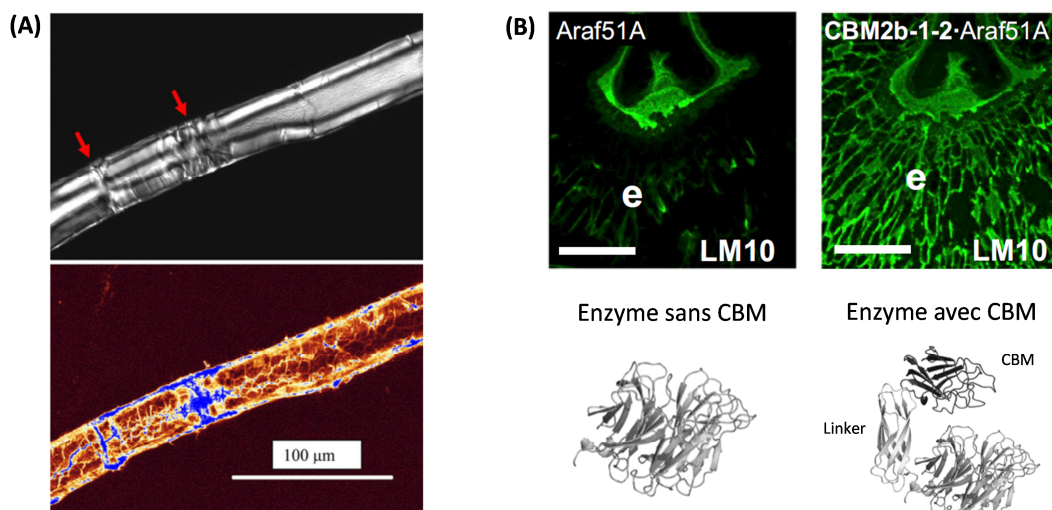


Fig.24. (A) Dégradation d'une fibre de cellulose par une endoglucanase, images de microscopie à lumière polarisée et microscopie confocale.¹⁰⁸ L'enzyme attaque la surface de la fibre et y pénètre par des points de fragilité structurale du matériau. (B) Dégradation d'une coupe de grain de blé par une arabinofuranosidase (Araf51A), images de microscopie à immunofluorescence, barre d'échelle 500 μm. Effet de la présence d'un CBM spécifique du xylane sur la quantité d'enzyme mise en œuvre lors de l'attaque.¹⁰⁶

Dans ce contexte, les questions spécifiques qu'il faut aborder sont les suivantes :

Cinétiques enzymatiques

. A quelle vitesse se déroule la dégradation enzymatique en situation d'interface et/ou faible teneur en eau et fort confinement spatial ? Les paramètres cinétiques d'une enzyme diffèrent-ils d'une attaque mesurée en *bulk*, cad en solution simple et diluée où le substrat spécifique de l'enzyme est moléculaire et ne forme pas d'interface ? Comment expliquer ces différences ?

Interactions-propagation

. Comment interagissent les enzymes avec une surface ? Comment se propagent-elles au sein d'une structure lignocellulosique ? La dégradation se fait-elle de manière homogène ou hétérogène ? S'il existe des hétérogénéités d'attaque, en quoi sont-elles liées aux hétérogénéités de structure et/ou de composition du substrat ?

. Combien d'enzymes sont mises en jeu lors de l'attaque ? Ce nombre évolue-t-il lors de la dégradation et de la résultante restructuration du substrat avec le temps ? Les enzymes s'organisent-ils d'une façon particulière pour dégrader l'interface ? Les interactions enzymes-enzymes ont-elles un rôle dans cette organisation ?

Relations structure-Fonction

. En quoi la présence d'un CBM vient-elle modifier le comportement d'une enzyme vis à vis des questions précédentes : cinétique, hétérogénéité de l'attaque, organisation spatiale ? Les enzymes possèdent-elles des propriétés intrinsèques spécifiques des caractères insoluble et confiné de leur substrat ?

3.2 Approche expérimentale et conceptuelle

Jusqu'à présent, les questions citées plus haut ont été abordées à travers les outils méthodologiques et conceptuels classiques de la biologie et de l'enzymologie ou en tout cas bien connus de ces communautés, comme la microscopie optique et le marquage spécifique d'enzymes et/ou composés de la biomasse par exemple.^{106,109} Mais ma conviction est que les moyens d'observation mis en œuvre en (bio-)physique et physique de la matière molle se prêtent également particulièrement bien à ces questions. C'est ici tout l'objet des recherches que je mène et que je compte mener sur les 10 prochaines années.

L'idée principale est de parvenir à saisir l'enzyme *au travail*, cad à l'approche de son substrat, ou bien avec la macromolécule qu'il est en train de dégrader, ou bien à la fin de son action. Les moyens d'observation potentiels et disponibles dans la communauté des physiciens et physico-chimistes sont nombreux. Il peut s'agir de techniques de visualisation directe (AFM, tomographie X), de caractérisation indirecte (diffusion de rayonnement, réflectivité de neutrons), ou d'autres moyens de mesures de l'activité et de la mobilité d'une enzyme (SPR, QCM-D, mesures de diffusion); l'essentiel de ces techniques permettant d'obtenir des informations aux échelles mésoscopiques et nanométriques. Concernant les substrats à mettre en œuvre avec ces techniques, il est envisageable dans certains cas d'utiliser des matériaux bruts et naturels (paille de blé par ex.). Une autre manière d'aborder les choses - et c'est celle que je vais privilégier dans mes recherches - est de travailler sur des substrats modèles simplifiés (mono-, bi-, tri-constituants), et qui reproduisent une ou plusieurs caractéristique(s) du substrat réel : situation d'interface, confinement.

A l'international, peu de groupes ont encore tenté ou adopté ce type d'approche. Concernant les techniques de visualisation directe, il est cependant difficile de ne pas citer cette étude fino-japonaise qui montre la progression d'une enzyme cellulolytique sur un brin de cellulose par AFM à grande vitesse.¹¹⁰ Des études sporadiques de groupes européens (Finlande, Suède) peuvent également être cités, notamment concernant des approches AFM ou des expériences préliminaires de diffusion de rayonnement aux petits angles.^{111,112} Mais ce sont des groupes américains qui se sont le plus attelés à des observations de ce genre, avec en particulier celui de Michael S. Kent (Sandia National Laboratories),¹¹³ et celui de Orlando Rojas (North Carolina State University).¹¹⁴ Il s'agit dans tous les cas de groupes clairement étiquetés *biomasse* et de nature multidisciplinaire. Il semble que les laboratoires de physico-chimie et physique des colloïdes *généralistes* et réputés (Lund, Zurich, Harvard par ex.) ne se sont pas encore directement intéressés au couple enzyme-substrat.

A l'échelle nationale, et hors INRA, on note bien sûr les travaux du CERMAV à Grenoble, où des physico-chimistes (e.g. Bruno Jean, Jean-Luc Putaux) caractérisent et manipulent les parois végétales et leurs composés, sans toutefois s'intéresser directement aux phénomènes de dégradation enzymatique de ces parois.^{115,116} Enfin au sein de l'INRA, c'est essentiellement le laboratoire BIA qui est coutumier des approches physico-chimiques comme la QCM-D, l'AFM, la réflectivité de neutrons, pour essentiellement la caractérisation de matériaux biosourcés, et, de façon récente et encore peu centrée sur les questions listées ci-dessus, pour la caractérisation de dégradations enzymatiques (Bernard Cathala et Céline Moreau, Estelle Bonin).¹¹⁷⁻¹¹⁹ L'INRA de Reims engage également un tournant de ce côté depuis l'arrivée de Gabriel Paës et les techniques de mesures de diffusion d'enzymes par FRAP dans des matrices lignocellulosiques.^{120,121}

Comme évoqué précédemment, l'approche que je privilégie dans mes recherches consiste à caractériser l'action enzymatique sur des *substrats modèles* et dans des conditions représentatives de la *réalité* du procédé : interface liquide-solide, fortes concentrations, complexité de composition. Je présente dans la suite les trois types de substrats modèles que j'ai choisi d'utiliser : (i) films minces, (ii) solutions semi-diluées, (iii) particules colloïdales. Avant ceci, je décris rapidement les polymères et les enzymes avec lesquels j'ai décidé de travailler en priorité.

Choix du substrat et de l'enzyme

Les recherches concernant la valorisation de la biomasse ont essentiellement focalisées sur la partie cellulosique de la biomasse (40% en masse). Ceci simplement parce que les débouchés du D-glucose, produit de dégradation de la cellulose, sont déjà très bien connus et qu'il existe de nombreux procédés de conversion du D-glucose en produits d'intérêt. La problématique de la dégradation et de la valorisation des hémicelluloses (jusqu'à 35% de la biomasse !) a beaucoup pâti de ce *gluco-centrisme*, alors même qu'il apparaît économiquement et écologiquement nécessaire de trouver à utiliser cette matière première.¹²² Les hémicelluloses sont des polymères de pentoses (essentiellement), avec une chaîne principale généralement constituée de xyloses et des branchements arabinose, mannose, et glucose. Le D-xylose et le L-arabinose sont les produits principaux d'une déconstruction totale d'une hémicellulose, et il existe de nombreuses voies possibles de valorisation de ces composés : biofuels, conversion en ingrédients pour l'industrie alimentaire, la pharmacie (probiotiques), ou la chimie (surfactants).

Dans le cadre de mes recherches, l'idée est donc d'utiliser comme matière première une hémicellulose modèle, extraite d'une biomasse réelle et suffisamment pure pour des expériences reproductibles. Après discussion avec mes collègues de l'équipe *catalyse et ingénierie enzymatique* du LISBP, mon choix s'est porté sur un arabinoxylane (AX) extrait du blé et commercialisé par Megazyme (P-WAXYL, pour *high purity wheat flour arabinoxylan of low viscosity*). Le polymère est constitué d'une chaîne principale d'unités D-xylose reliées en β -(1 $\rightarrow$ 4) sur lesquelles viennent se greffer des unités L-arabinose sur les oxygènes positionnés en C2 et/ou C3 (Fig.25A).

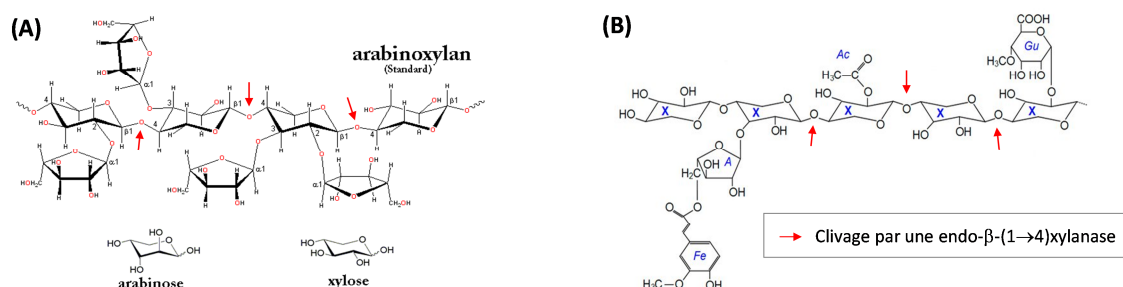


Fig.25. (A) Structure générique d'un arabinoxylane. (B) Certains substituts arabinose peuvent porter un acide férulique (Fe), un groupement acétyle (Ax), ou un acide méthyl glucuronique (Glu). Les flèches rouges indiquent les zones de clivage d'une endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)xylanase.

La répartition des substitutions (type et nombre) sur la chaîne de xylose est pseudo-aléatoire et peut varier d'une espèce végétale à l'autre. La solubilité du polymère dans l'eau dépend de sa taille et de son degré de substitution. Les AX les plus substitués sont les plus solubles dans l'eau, les substitués arabinose latéraux venant empêcher les chaînes de xylane de s'associer les unes aux autres par formation de liaisons hydrogènes.¹²³ Le degré de substitution du P-WAXYL est de 0.6 (6 résidus arabinose pour 10 xyloses), lui assurant ainsi une très bonne solubilité dans l'eau. Dans la nature, et donc vraisemblablement avec le polymère que nous utilisons, certains substitués arabinose portent des fonctions féruliques, acétiques, et glucuroniques (Fig.25B). Seules les fonctions acide glucuronique portent une charge négative à des pH usuels ($pK_a \approx 3.5$). Elles sont peu nombreuses sur une même chaîne et l'AX peut raisonnablement être considéré comme un polymère globalement non chargé. Des expériences SEC-MALS réalisées en 2014 sur ce polymère indiquent une polydispersité en taille assez importante avec une masse molaire en poids $M_w = 400$ kDa et en nombre $M_n = 150$ kDa. Son R_g moyen est de 57 nm.

Concernant les enzymes, il s'agit d'étudier principalement l'activité endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)xylanase et donc le clivage de la chaîne principale de l'AX entre deux monomères de xylose (flèche rouge sur la Fig.25). Cette fonction intéresse particulièrement mes collègues du LISBP (Cédric Montanier, Claire Dumon), et l'idée est que les approches que je développe puissent aider ces chercheurs à caractériser les enzymes qu'ils découvrent et étudient. En guise de *témoin*, nous utiliserons la xylanase NpXyn11A, enzyme connue et bien caractérisée dont il est possible de produire un mutant inactif.¹⁰² Il est également possible, par des techniques maîtrisées au LISBP de produire une NpXyn11A sur laquelle un CBM aura été greffé. Dans notre cas, un bon candidat est le CBM *CBM2b-1*, spécifique des arabinoxylyanes.¹²⁴

(i) Films minces

Dans ce premier cas, le substrat modèle est une interface plane constituée du polymère choisi, cad un film mince de ce matériau (10-100 nm). Le film est ensuite mis au contact d'une solution enzymatique et l'action de l'enzyme est suivie par différentes techniques d'analyse ex-situ ou in-situ : QCM-D pour la perte de masse et les propriétés viscoélastiques du film en cours de dégradation, ellipsométrie pour l'épaisseur de la couche, SPR, réflectivité X ou de neutrons pour la composition du film dans son épaisseur, microscopie AFM pour une vision directe de l'effet de l'enzyme sur la topographie de surface. Par ce type d'approche, la question de l'action enzymatique sur une interface solide est directement abordée.

Le principe d'un tel suivi n'est pas nouveau et des expériences de ce type, généralement fondées sur la technique QCM-D, ont été reportées par plusieurs groupes ces dernières années.^{114,119,125,126} Cependant ces travaux se cantonnent presque exclusivement à l'étude de cellulases et de substrats cellulotiques; délaissant ainsi les substrats hémicellulosiques, les enzymes capables de les dégrader, et les spécificités de ces systèmes. Aussi le problème de la déconstruction enzymatique est systématiquement abordé de l'unique point de vue du substrat : les chercheurs utilisent une enzyme particulière (voire un cocktail d'enzymes commercial), modifient la structuration et/ou la composition du substrat, et regardent l'incidence de ces modifications sur les étapes de la déconstruction telles que caractérisées par QCM-D. Il semble cependant possible et prometteur de

compléter cette approche par l'utilisation d'enzymes produites par ingénierie enzymatique, aux propriétés modulées par mutation de certains acides aminés. Ceci permettrait d'aborder le problème dans toute sa dimension, et de répondre à des questions relevant tout autant du substrat que des relations structure-fonction des enzymes étudiées et/ou des séquences d'actions enzymatiques mises en jeu. Enfin rares sont les auteurs se risquant à confronter les signaux *bruts* issus d'une expérience QCM-D à des modèles physiques permettant de décrire l'évolution des propriétés du film au cours d'une dégradation enzymatique.¹²⁵ La modélisation des tracés QCM-D obtenus lors de la digestion enzymatique d'un film reste donc un véritable challenge. Elle est pourtant indispensable à la quantification précise des phénomènes mis en jeu : adsorption irréversible, *binding* (= association spécifique enzyme-substrat), et clivage enzymatique.

Plusieurs stratégies sont possibles pour préparer un film mince d'un AX sur une surface. La première et certainement la plus simple consiste à laisser s'adsorber spontanément le polymère sur une surface. Sur les surfaces d'or que constituent généralement les capteurs ou cristaux de QCM-D, la quantité d'AX adsorbée est de l'ordre du mg par m² quand le cristal est mis au contact d'une solution d'AX à ~1 g/L. Cette adsorption est irréversible et le film ne se redisperse pas par lavage avec de l'eau. On ne contrôle pas la structure du film dans ce cas et les chaînes sont vraisemblablement adsorbées de façon aléatoire sur la surface. La Fig.26A montre le résultat d'expériences QCM-D de suivi de la dégradation d'un film d'AX produit de cette façon par trois enzymes que nous nommerons A, B et C. La perte de masse des films est normalisée par leur masse initiale m_i et portée en fonction du temps de contact avec la solution enzymatique.

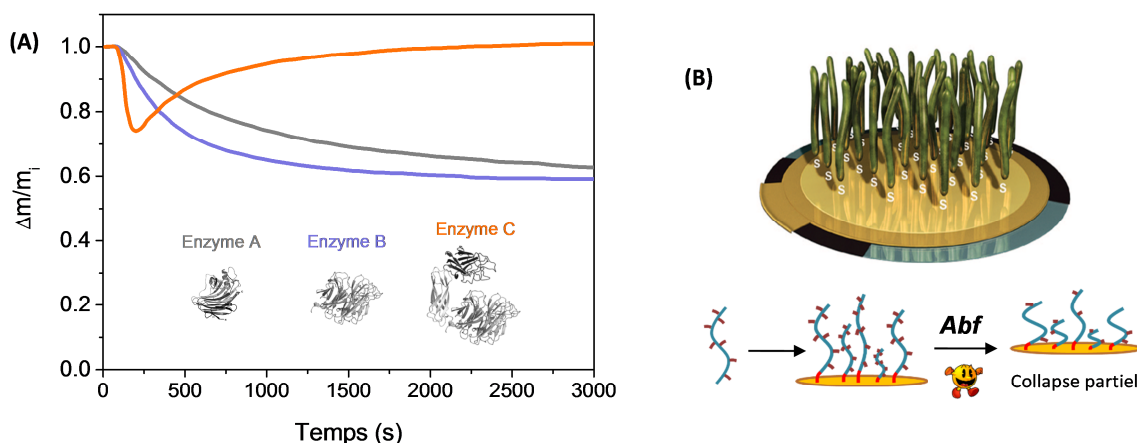


Fig.26. (A) Mesure QCM-D de la dégradation enzymatique d'un film d'AX préparé par adsorption simple. (B) Principe de formation d'une brosse d'AX par greffage sur une surface. Modulation de l'hydratation par traitement avec une arabinofuranosidase (Abf). Illustration tirée des travaux de Nordgren et al.¹¹¹

Les paramètres cinétiques ($\approx$ nombre de coupures par unité de temps pour une concentration donnée en enzyme) de ces trois enzymes vis à vis de l'AX ont été préalablement mesurés en *bulk*, cad dans une solution de cet AX. Les concentrations enzymatiques utilisées en QCM-D ont été ajustées de façon à ce que ces cinétiques soient parfaitement identiques pour les trois enzymes. Pourtant les

cinétiques observées sur la Fig.26A vis à vis de chaînes d'AX adsorbées sur une surface sont clairement différentes. La perte de masse dans le film est plus rapide pour l'enzyme B que pour l'enzyme A, deux enzymes de composition et structure différentes. Ceci peut s'expliquer par (1) un nombre de coupures équivalent au même temps mais des fragments de chaînes libérés de tailles différentes dans les deux cas, d'où des pertes de masse dissimilaires, (2) un nombre de coupure par unité de temps effectivement plus élevé pour l'enzyme B, suggérant que cet enzyme est plus adaptée à attaquer une interface que l'enzyme A (meilleure affinité pour un film ? meilleure propagation dans la structure du film ?). L'enzyme C est quant à elle identique à l'enzyme B mais possède un CBM spécifique des arabinoxylnes. Dans ce cas la perte de masse aux premiers instants est encore plus rapide que pour l'enzyme B. Après un certain temps, le film regagne ensuite de la masse, ce que nous expliquons par la forte affinité des enzymes avec CBM pour le film : à mesure que l'enzyme travaille, le film est dégradé jusqu'au point où il ne peut plus être déconstruit (60% de sa masse est insensible à l'enzyme, cf les résultats pour les enzymes A et B); le gain de masse dû à l'affinité enzyme-substrat devient alors visible.

Les résultats ci-dessus sont très préliminaires, et il pourrait être intéressant de continuer à travailler avec ce type de films. Aussi nous pourrions compléter ces résultats par des mesures AFM ou d'ellipsométrie par exemple. Mais une difficulté réside dans l'interprétation des données et la modélisation des pertes de masse pour obtenir les véritables caractéristiques de l'action enzymatique : affinité enzyme-substrat, nombre de coupure par unité de temps. En particulier, il est probable que certains événements enzymatiques de clivage ne soient pas répercutés sur la masse du film; si une chaîne est attachée en plusieurs points à ces congénères ou à la surface d'or par exemple.

Pour qu'il y ait un lien direct entre clivage enzymatique et perte de masse, une possibilité est de faire un film constitué d'une *brosse* des chaînes d'AX dans laquelle chaque brin est indépendant et attaché en un seul point à la surface du cristal QCM-D. Dans un article récent, Norgren et al. considèrent avoir réussi à préparer une brosse de ce type avec un polysaccharide à la composition proche d'un AX (xyloglucane).¹¹¹ Le polymère est modifié en bout de chaîne par adjonction d'un thiosemicarbazide. Cette fonction soufrée permet aux chaînes polymériques de se chimisorber par leur extrémité sur une surface d'or de façon irréversible, et de former ainsi un film de type brosse (Fig.26B). Nous avons exploré cette voie pendant plusieurs mois au LISBP, mais nous nous sommes heurtés à de nombreuses difficultés qui nous ont peu à peu fait abandonner l'approche : dangerosité de la modification chimique de l'AX, purification des produits synthétisés, quantification des rendements, effet peu convaincant de la modification sur la masse du film en QCM-D. Mais je n'abandonne pas l'idée de la préparation d'une brosse d'AX par un moyen qui semble plus simple à mettre en œuvre et sans doute plus efficace. La technique m'est inspirée par de récents travaux du groupe d'Orlando Rojas.¹²⁷ Elle consiste dans un premier temps à oxyder l'AX en bout de chaîne pour y introduire un groupe carboxyle. Il s'agit ensuite d'utiliser la *classique* chimie EDC/NHS pour greffer l'AX par son extrémité sur une monocouche d'alcanethiol auto-assemblée sur le cristal d'or et présentant des fonctions NH₂ en surface. Nous avons fait de premiers essais de manipulations et les résultats sont prometteurs. Si nous sommes capables de produire des *films brosses* d'AX de façon reproductible, une possibilité à moyen terme serait de jouer sur la teneur en eau dans les films par hydrolyse enzymatique partielle des résidus arabinoses sur les chaînes de xylnes (Fig.26B). Nous utiliserons pour cela des arabinofuranosidases disponibles au LISBP. Cet *élagage* partiel de la chaîne principale aura pour effet de rendre moins soluble le polymère et de le faire s'effondrer en partie ou en totalité.

Avec les films ainsi préparés, nous aurons un moyen judicieux d'étudier l'effet du confinement du film sur l'action enzymatique d'une xylanase.

(ii) Solutions concentrées

De façon cette fois-ci à aborder la question de l'action enzymatique en milieu concentré, je propose de suivre l'action des enzymes sur des solutions d'AX préparées à différents degrés de confinement. Un premier type d'expérience consiste à disperser les enzymes de façon homogène dans des solutions elles-mêmes homogènes et préparées à différentes concentrations d'AX, du régime dilué ($C < C^*$) jusqu'aux régimes semidilué et concentré ($C > C^*$). L'action enzymatique est ensuite suivie sur différents plans :

- . sur le plan de la cinétique simple de la réaction, par une détermination du nombre de coupures par unité de temps en utilisant des techniques colorimétriques type Nelson-Somogyi.¹²⁸
- . sur le plan de la nature des fragments relargués, par des mesures SEC-MALS de la distribution de taille de ces fragments.¹²⁹
- . sur le plan de la structure et de l'organisation dans l'espace des chaînes de polymère et des enzymes, par des expériences de diffusion de rayonnement SAXS et/ou SANS.
- . sur le plan de la dynamique et de la mobilité des chaînes d'AX, par des techniques RMN (vitesse de relaxation $1/T_2$) ou de *laser speckle imaging* par exemple.¹³⁰
- . sur le plan des propriétés viscoélastiques des solutions par des mesures de rhéologie (viscosité et/ou modules visco-élastiques)

Tout l'intérêt est d'analyser l'effet de la concentration sur chacun de ces indicateurs, avec à la clé de nombreuses et - à mon sens - inédites informations sur l'action enzymatique en milieu confiné. On peut par exemple imaginer que dans des conditions de fortes concentrations, les enzymes ne soient que très peu mobiles et n'aient accès qu'aux chaînes de substrat qui se trouvent à leur proximité immédiate. Dans ce cas la relation nombre de coupure / nature des fragments relargués pourrait être très différente de ce qui est mesuré en régime dilué, avec des fragments vraisemblablement plus petits en situation confinée. Aussi la présence de ces enzymes *coincées* dans le matériau pourrait engendrer la formation transitoire d'hétérogénéités de structure en son sein (= des zones où les chaînes sont plus courtes et plus mobiles qu'alentour). Enfin il paraît également possible d'observer des phénomènes de latence en milieu très concentré, avec un temps d'induction de l'action enzymatique pendant lequel l'enzyme travaille peu mais se libère petit à petit de son emprisonnement spatial pour finalement travailler plus facilement et plus rapidement.

Nous avons déjà quelque peu avancé sur ces approches, avec la préparation réussie de solutions d'AX par stress osmotique jusqu'à des concentrations pouvant atteindre 600 g/L, soit très largement au-dessus du C^* pour ce polymère (2 g/L selon nos mesures de viscosité) et une situation où la distance entre brins de polymère est vraisemblablement similaire à la longueur de persistance de l'AX. Nous n'avons pas encore étudié de façon systématique l'action d'une enzyme sur ces dispersions. Mais nous avons cependant quelques premiers résultats intéressants de structure SANS obtenus courant 2016 sur la ligne D11 de l'ILL à Grenoble avec Ralf Schweins, responsable de la ligne, et Bernard Cabane. Je donne un aperçu de ces résultats sur la Fig.27 pour une concentration en AX de 40 g/L.

A faible vecteur d'onde q (région 1), l'intensité diffusée résulte de la présence probable de larges clusters ou amas de chaînes d'AX faiblement hydratées.^{131,132} Aux échelles intermédiaires (région 2), l'intensité provient de zones différentes de l'échantillon où les chaînes d'AX sont en condition de bon solvant et forment un réseau enchevêtré ($C > C^*$). La longueur de corrélation ξ du réseau (~ 60 Å), cad la taille approximative de la maille du réseau, est calculée à partir de modèles classiques pour ce type de système.¹³³ A grand q (région 3), le signal informe sur la conformation locale des chaînes et l'intensité est décrite par un modèle WLC (*worm like chain*) pour des polymères semi-flexibles.

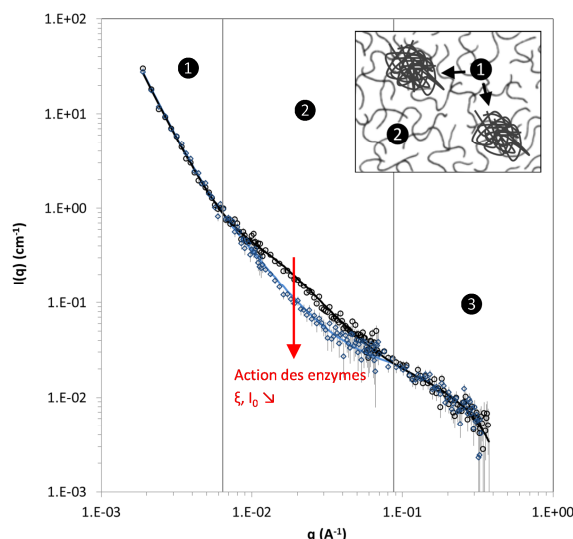


Fig.27. Structure SANS d'une solution semidiluée d'AX à 40 g/L avant (cercles noirs) et après (diamants bleus) action d'une endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)xylanase à 10^{-5} M pendant 48 h. Les lignes pleines sont le résultat d'une modélisation qui tient compte de la présence d'amas denses d'AX (1) séparés par des chaînes d'AX en bon solvant (2).

Après 24 h de l'action de l'enzyme, le profil SANS ne change pas dans les régions 1 et 3. Il est par contre clairement affecté aux échelles intermédiaires avec une diminution de l'intensité diffusée et de la longueur de corrélation ξ obtenue par le fit (de ~ 60 Å à ~ 25 Å). Deux scénarios peuvent expliquer cette diminution du ξ :

- (1) Les enzymes attaquent préférentiellement les clusters d'AX faiblement hydratés. Cela n'a pas d'effet direct à petit q car les clusters ne changent pas foncièrement de taille ni de nombre. Cependant la dégradation des clusters vient libérer des chaînes longues dans les régions hydratées de l'échantillon, venant ainsi augmenter l'enchevêtrement des chaînes dans ces zones et diminuer ξ .
- (2) Les enzymes travaillent préférentiellement dans les zones hydratées de l'échantillon et la dégradation est si efficace que des chaînes plus petites que la maille du réseau sont produites, faisant ainsi diminuer la longueur de corrélation moyenne ξ .

Il s'agit maintenant d'aller au-delà de ces premiers résultats et de discriminer ces deux scénarios par une étude SANS plus systématique (un proposal a été déposé en ce sens) et les expériences complémentaires décrites plus haut : cinétique, SEC-MALS, dynamique.

J'envisage de réaliser un second type d'expérience utilisant des solutions semi-diluées et concentrées d'AX, dans le but cette fois de suivre la propagation et la migration des enzymes dans le matériau (cf Fig.28).

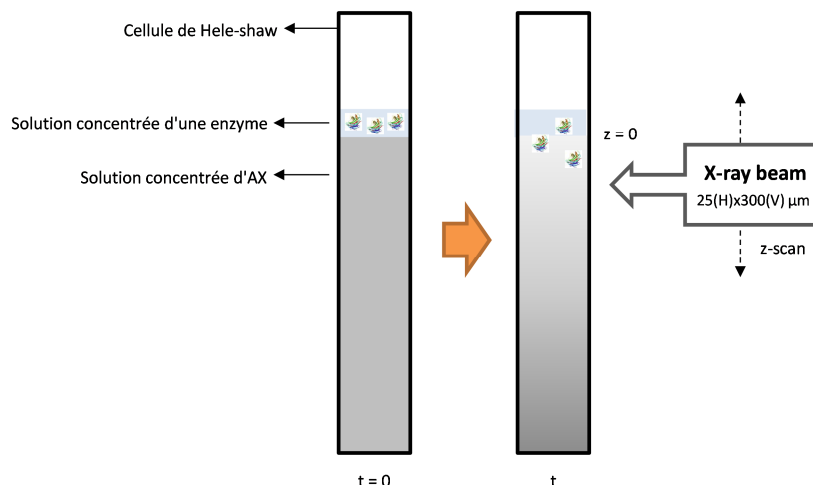


Fig.28. Principe du suivi SAXS d'un front de dégradation enzymatique dans une solution semidiluée d'AX. Un proposal a été déposé début 2017 sur le synchrotron Soleil.

Jusqu'à présent, les études portant sur la mobilité des enzymes dans des structures lignocellulosiques se limitent à des mesures de *self-diffusion* (cad en dehors de tout gradient en concentration des enzymes) d'enzymes inactives ou de traceurs inertes, qui ne modifient en rien la structure ou les propriétés du medium quand ils y progressent.¹²¹ Au contraire les expériences que je propose visent à caractériser le comportement d'enzymes *actives*, dans un fort gradient de concentration en enzyme. Brièvement, l'idée est de déposer un petite volume de solution enzymatique à la surface d'une dispersion concentrée d'AX disposée dans une cellule de type Hele-Shaw (Fig.28). Des spectres SAXS de la dispersion, pris à différents temps et différentes distances à partir du point d'entrée des enzymes ($z = 0$), nous donnerons des indications quant aux changements de structure dans la solution d'AX (e.g. longueur de corrélation, cf Fig. 27). Parallèlement, des expériences de microscopie à fluorescence, réalisées dans les mêmes conditions mais avec des enzymes rendues fluorescentes, permettront de suivre l'évolution du gradient en concentration d'enzyme dans la direction z en fonction du temps. L'objectif est de pouvoir comparer les deux gradients : concentration en enzymes, longueurs caractéristiques du polymère, de façon à caractériser précisément le déroulement de la dégradation. On peut également imaginer d'employer la technique de *laser speckle imaging* pour suivre le changement de dynamique des chaines dans cette configuration;¹³⁰ changement qui devraient être clairement visible à mesure que des chaines plus petites et plus mobiles sont créées lors de la progression des enzymes.

(iii) Particules colloïdales

Un moyen de reproduire une situation d'interface et/ou de très forts gradients en substrat est de confronter les enzymes à des particules de lignocellulose. Un choix véritablement stratégique

concerne la taille des particules à utiliser. Une possibilité est de rester dans les conditions du procédé et donc d'utiliser des particules millimétriques ou microniques issues du broyage d'un substrat naturel. Avec de telles particules macroscopiques, les techniques directes de suivi de l'action enzymatique (microscopie électronique, X, ou de fluorescence notamment) offrent des possibilités intéressantes. Elles ne donnent toutefois aucune indication sur le comportement individuel ou collectif des enzymes à leur échelle (nanométrique). La seconde possibilité est donc d'utiliser des particules de tailles voisines de celles des enzymes (50-200 nm max), de façon à ce que l'action individuelle d'une enzyme - un évènement catalytique ou la simple adhésion de l'enzyme au substrat - engendre une modification détectable des propriétés de la particule : taille, structure, propriétés de l'interface, homogénéité de composition (Fig.29).

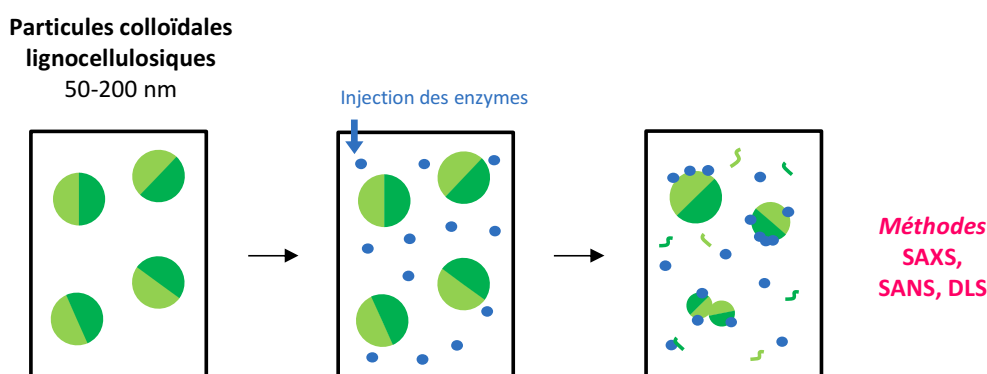


Fig.29. Suivi des interactions enzyme-substrat et de la dégradation enzymatique en utilisant des particules colloïdales de lignocellulose.

Les particules colloïdales doivent être représentatives de la composition de la biomasse lignocellulosique et des différentes interactions entre les composants de cette biomasse. Je vois deux voies potentielles d'obtention de telles particules : (1) les synthétiser à partir de certains des composant majoritaires de la biomasse (cellulose, hémicellulose, lignine), (2) fragmenter et broyer un substrat naturel jusqu'aux échelles colloïdales. Dans tous les cas, l'idée est bien sûr d'avoir des particules aux propriétés bien caractérisées voire contrôlées. Il serait également intéressant de produire des particules de complexité variable en termes de composition; ce qui est envisageable à travers la voie d'obtention (1).

Concernant la synthèse de particules lignocellulosiques colloïdales, une possibilité est de s'inspirer de travaux initiés à l'INRA de Reims et Nantes à travers la thèse d'Abdelatif Barakat notamment.¹³⁴⁻¹³⁶

Un monomère de la lignine (alcool coniférylique) est polymérisé en présence d'une hémicellulose. Il en résulte des colloïdes de taille 10-100 nm, vraisemblablement de nature *core-shell*, avec un cœur de lignine et une couronne moins dense de xylane. Ce sont des colloïdes mous et déformables, de densité interne plutôt faible (150 g/L) mais ajustable à la hausse. Le xylane interagit avec la lignine via des interactions hydrophobes mais des liaisons covalentes lignine-xylane sont également formées lors de la synthèse. Selon les auteurs, les suspensions de ces particules sont stables sur des périodes longues (mois). Nous avons fait dernièrement de tout premiers essais de synthèse de particules AX-

alcool coniférylique en suivant les protocoles de nos collègues. Les particules obtenues sont un peu plus grosses qu'attendu (100-200 nm), mais restent de taille colloïdale.

Concernant la possibilité de fractionner une biomasse naturelle jusqu'aux échelles colloïdales, l'idée paraît simple et elle a l'avantage de conserver la complexité structurale et compositionnelle de la biomasse et de maintenir les interactions *natives* entre ses différents constituants. Mais la mise en œuvre d'un tel broyage paraît compliquée et il n'existe à ma connaissance aucun exemple dans la littérature. Dans le cas d'une biomasse *brute*, le danger pourrait être la possible ré-agglomération des particules fines en cours de broyage, ce qui empêcherait d'atteindre des tailles colloïdales. A contrario, le relargage de composés amphiphiles en cours de broyage pourrait également stabiliser les particules fines. On pourrait aussi imaginer de modifier le pH ou d'autres conditions physico-chimiques en cours de broyage pour limiter cette ré-agglomération. Il s'agit dans tous les cas d'un travail de longue haleine et je ne compte pas essayer cette voie d'obtention des particules dans un premier temps. J'ai cependant commencé de me rapprocher de collègues INRA (Abdellatif Barakat, Montpellier) et CNRS (Christine Frances, LGC) pour discuter de la faisabilité de l'opération et faire de premiers essais dans les années à venir.

Une fois les particules colloïdales synthétisées, l'objectif est de suivre le déroulement de leur dégradation par des enzymes aux propriétés contrôlées. Les grandeurs pertinentes sont :

- . nombre, taille, polydispersité des particules après contact avec l'enzyme active (dégradation) ou l'enzyme inactive (adsorption)
- . degré de dissociation, nombre et taille de chaînes relarguées lors de l'attaque
- . variation des propriétés de l'interface (rugosité) et/ou de la structure interne des particules (inhomogénéités)
- . organisation des particules dans la solution lors du traitement enzymatique : interactions, agrégation, séparation de phase

Les techniques à privilégier pour réaliser un tel suivi sont celles utilisées classiquement en physique des colloïdes : diffusion de rayonnement (SAXS/SANS), DLS, turbidité, imagerie AFM & SEM, rhéologie et pression osmotique des dispersions.

Concernant les techniques de diffusion de rayonnement, SAXS et SANS peuvent caractériser les particules avant et en cours de dégradation, et en particulier caractériser la nature de l'interface particule / solution : cette interface est-elle lisse, de nature fractale, ou de type brush/buissonneuse ? quelle est la surface spécifique ? De même, SAXS et SANS sont un moyen d'accéder à la structure globale des objets et à l'évolution de cette structure avec la dégradation : tailles, polydispersité, rayons de giration, inhomogénéité de composition. Les interactions enzymes-particules peuvent aussi être étudiée spécifiquement par SAXS/SANS. Avec un enzyme inactive, on pourrait ainsi quantifier l'adsorption enzyme-particule en fonction de la concentration en enzyme, de façon à voir s'il existe des régimes *pauvres* et *riches* en enzymes.

Les techniques de microscopie haute résolution de type SEM et AFM peuvent aussi apporter des informations qualitatives intéressantes de type morphologique sur le déroulement de la dégradation. On peut aussi imaginer obtenir des informations plus quantitatives via l'AFM en mesurant le module viscoélastique des particules en cours de déconstruction par exemple. Enfin on peut envisager de suivre la dégradation de façon moins directe - mais tout aussi intéressante - par l'intermédiaire de

grandeurs physiques comme les propriétés rhéologiques ou osmotiques des suspensions. La viscosité des suspensions colloïdales, ou leur viscoélasticité dans le cas de suspensions concentrées, renseignent sur les interactions et la structuration des objets en présence. La pression osmotique est quant à elle extrêmement sensible au nombre d'objets en présence et à leurs interactions. Suivre ces grandeurs, en cours de dégradation, pourrait être utile et très complémentaire des techniques de caractérisation directe citées plus haut.

[Substrat naturel brut / Immobilisation d'enzymes sur des surfaces]

De façon moins personnelle (je ne suis pas l'instigateur des travaux), je suis impliqué depuis peu dans un projet porté par Cédric Montanier et visant à suivre la dégradation enzymatique de coupes de paille de blé par combinaison de techniques d'imagerie à différentes échelles : tomographie X et AFM. Mes perspectives de recherche englobent bien sûr ce travail, même s'il dépasse le cadre strict des approches présentées ci-dessus sur des systèmes modèles de structure et composition bien moins complexes. Enfin toujours en marge de mes activités principales au LISBP, je participe avec Cédric Montanier à l'analyse et à l'interprétation de résultats que ce dernier a obtenus concernant l'immobilisation d'enzymes lignocellulolytiques à la surface de billes microniques et sur l'activité enzymatique des objets ainsi construits (article AP5).]

3.3 Moyens

Pour m'aider au déploiement des perspectives de recherche que je viens de présenter, je dispose du franc soutien de l'INRA et du département CEPIA à travers un projet ANS à mon arrivée au LISBP (2013-2015) et surtout la bourse de thèse INRA-Région de Lucie Dianteill (2016-2019, cf partie 1.3). Je n'ai pour l'instant pas obtenu d'autre soutien financier par mes propres moyens, et il faudra bien sûr que je m'attelle au dépôt de projets type ANR et autre (j'ai déposé un projet ANR JCJC en octobre 2015, non retenu). Mon équipe d'accueil - TIM - s'est engagée à soutenir mes activités pour les 2-3 prochaines années en pourvoyant aux frais de fonctionnement de la thèse que j'encadre.

Du point de vue des techniques expérimentales, le LISBP, et notamment l'équipe *catalyse et ingénierie enzymatique* avec qui je collabore directement, dispose de tous les équipements nécessaires pour la production des enzymes, leur purification et leur caractérisation biochimique. Les techniques de caractérisation physique que j'utilise et compte utiliser dans la suite sont par contre très peu représentées au LISBP. Mais la plupart de ces techniques sont disponibles sur Toulouse dans des laboratoires que je connais bien ou desquels je me suis fait connaître ces 2-3 dernières années. Je pense notamment à l'ITAV pour les équipements AFM et QCM-D, le CIRIMAT pour l'ellipsométrie, ou encore le LGC pour son équipement SAXS récent et particulièrement performant. A ce titre, l'existence de la fédération FERMaT sur le site toulousain est un atout majeur car la fédération permet à la fois d'apporter les fonds pour l'achat de gros instruments et de mettre en relation des chercheurs de différents horizons de façon à partager les savoirs et compétences techniques de chacun.

Enfin dans les années à venir, il me semble important de faire connaître mon travail aux industriels travaillant sur la valorisation de la biomasse. Mon expérience est que ce type de dialogue met un certain temps à s'établir, et que c'est généralement à partir de résultats scientifiques existants que des discussions peuvent naître (c'est ce qui s'est passé à Rennes avec des contacts avec BBA et la société Bel par exemple). Un moyen d'approcher les industriels du secteur est sans doute d'utiliser la structure TWB présente sur Toulouse. Une idée, qui pourrait se concrétiser à moyen ou long terme, serait de proposer aux industriels de TWB un projet inter-équipe, qui s'attèle à un travail multi-échelle et multidisciplinaire (ingénierie enzymatique, (bio-)physique, génie des procédés) sur un procédé en particulier; à l'image de ce que j'ai pu faire à Rennes sur la filtration du lait.

4 Conclusion

Voici maintenant un peu plus de 10 ans que je suis chercheur INRA; une période riche et marquée par un changement radical de thématique de recherche à mon intégration au LISBP récemment. C'est avec constance et je pense cohérence que j'ai abordé et continue d'aborder les questions qui m'ont été confiées ou que j'ai choisi de traiter. Cette cohérence scientifique est à l'origine du titre de ce mémoire. Elle découle de mon (intacte) conviction que nous avons *toujours* tout à gagner à caractériser, aux *échelles intermédiaires* (nm $\rightarrow$ μ m) et par des moyens *physiques*, les mécanismes mis en œuvre dans un procédé de transformation pour mieux le comprendre et l'optimiser. L'approche n'est de fait pas classique dans le domaine du génie de procédés. Mais elle n'en n'est pas pour autant marginale et elle se développe dans de nombreux groupes de recherche internationaux et nationaux (en témoigne le succès du GdR AMC2 pour la France).

A ma première affectation au STLO de Rennes, j'ai sciemment décidé d'aborder la problématique qui m'était confiée par ce type d'approche. Pour étudier la filtration du lait, je suis en quelque sorte *sorti* du procédé - ce qui n'avait pour ainsi dire jamais été fait dans le domaine - pour m'intéresser spécifiquement aux interactions entre micelles de caséine aux fortes concentrations, à l'organisation des objets dans les dispersions, et à l'impact des interactions et de la structure sur les propriétés rhéologiques et diffusionnelles des systèmes concentrés. Mes collègues et moi-même avons ensuite démontré que les données recueillies étaient pour le moins éclairantes sur le déroulement d'une filtration, et qu'elles pouvaient être utilisées pour modéliser et prédire la filtration frontale d'un lait. Les perspectives de ces travaux sont nombreuses mais ne m'impliquent plus directement maintenant. Elles concernent notamment la meilleure compréhension des mécanismes d'adhésion entre micelles de caséine et la modélisation de la filtration en mode tangentiel.

Au cours de mes dernières années à Rennes et pendant cette période césure que j'ai vécue au LGC avant mon affectation au LISBP, j'ai impulsé à mes travaux un mouvement à la fois de diversification et de généralisation : diversification à travers des travaux sur la structure de la micelle de caséine ou les interactions entre protéines globulaires aux fortes concentrations, généralisation par une étude - encore en cours - du comportement d'objets modèles déformables et compressibles en filtration et compression. Dans tous les cas, je conservais et conserve ce tropisme vers une caractérisation fondée sur des concepts et outils de la physico-chimie et de la physique de la matière molle. C'est au moment où j'entamais ces différents travaux que des collègues INRA et moi-même avons réalisé que nous partagions cette inclinaison pour des approches *soft matter*. Nous sommes à présent en train de publier un article qui revient sur les différentes thématiques INRA abordées par ce prisme (article AS1). Avec les mêmes personnes, nous travaillons actuellement sur une *review* plus exhaustive concernant l'application des concepts de la matière molle aux *food sciences* (article AP2).

Le virage que j'ai entrepris à mon arrivée au LISBP est important - il y a en effet peu de point commun entre la filtration du lait et la déconstruction enzymatique de la biomasse - mais il s'agit d'un virage thématique uniquement. Concernant la démarche, je persiste et envisage encore de suivre les processus mis en jeu dans le procédé de déconstruction par des expériences physiques réalisées dans des situations modèles, sur des objets modèles, et aux petites échelles. Il s'agit à présent de convaincre mes collègues directs, le laboratoire, et le reste de la communauté scientifique que cette orientation est pertinente.

5 Références

1. Kim, Y. H. & Moon, S.-H. Lactic acid recovery from fermentation broth using one-stage electrodialysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 169–178 (2001).
2. Kunz, W., Henle, J. & Ninham, B. W. ‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **9**, 19–37 (2004).
3. Bargeman, G., Vollenbroek, J. M., Straatsma, J., Schroën, C. G. P. H. & Boom, R. M. Nanofiltration of multi-component feeds. Interactions between neutral and charged components and their effect on retention. *J. Membr. Sci.* **247**, 11–20 (2005).
4. Escoda, A., Fievet, P., Lakard, S., Szymczyk, A. & Déon, S. Influence of salts on the rejection of polyethyleneglycol by an NF organic membrane: Pore swelling and salting-out effects. *J. Membr. Sci.* **347**, 174–182 (2010).
5. Nilsson, M., Trägårdh, G. & Östergren, K. The influence of pH, salt and temperature on nanofiltration performance. *J. Membr. Sci.* **312**, 97–106 (2008).
6. Luo, J. & Wan, Y. Effects of pH and salt on nanofiltration—a critical review. *J. Membr. Sci.* **438**, 18–28 (2013).
7. Galier, S. & Roux-de Balman, H. The electrophoretic membrane contactor: A mass-transfer-based methodology applied to the separation of whey proteins. *Sep. Purif. Technol.* **77**, 237–244 (2011).
8. Fuoco, A., Galier, S., Roux-de Balman, H. & De Luca, G. Correlation between macroscopic sugar transfer and nanoscale interactions in cation exchange membranes. *J. Membr. Sci.* **493**, 311–320 (2015).
9. Umpuch, C., Galier, S., Kanchanatawee, S. & Balman, H. R. Nanofiltration as a purification step in production process of organic acids: Selectivity improvement by addition of an inorganic salt. *Process Biochem.* **45**, 1763–1768 (2010).
10. Belfort, G., Davis, R. H. & Zydney, A. L. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *J. Membr. Sci.* **96**, 1–58 (1994).
11. Rout, M. P. *et al.* The Yeast Nuclear Pore Complex. *J. Cell Biol.* **148**, 635–652 (2000).
12. Raveh, B. *et al.* Slide-and-exchange mechanism for rapid and selective transport through the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E2489–E2497 (2016).
13. Ducker, W. A., Senden, T. J. & Pashley, R. M. Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope. *Nature* **353**, 239–241 (1991).
14. James, B. J., Jing, Y. & Dong Chen, X. Membrane fouling during filtration of milk—a microstructural study. *J. Food Eng.* **60**, 431–437 (2003).

15. Brans, G., Schroen, C. G. P. H., Van Der Sman, R. G. M. & Boom, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Membr. Sci.* **243**, 263–272 (2004).
16. Gésan-Guizieu, G., Boyaval, E. & Daufin, G. Critical stability conditions in crossflow microfiltration of skimmed milk: transition to irreversible deposition. *J. Membr. Sci.* **158**, 211–222 (1999).
17. Jimenez-Lopez, A. J. E. *et al.* Role of milk constituents on critical conditions and deposit structure in skimmilk microfiltration (0.1µm). *Sep. Purif. Technol.* **61**, 33–43 (2008).
18. Rabiller-Baudry, M., Gesan-Guizieu, G., Roldan-Calbo, D., Beaulieu, S. & Michel, F. Limiting flux in skimmed milk ultrafiltration: impact of electrostatic repulsion due to casein micelles. *Desalination* **175**, 49–59 (2005).
19. Bowen, W. R. & Williams, P. M. Quantitative predictive modelling of ultrafiltration processes: Colloidal science approaches. *AdvColloid Interface Sci* **134–135**, 3–14 (2007).
20. Elimelech, M. & Bhattacharjee, S. A novel approach for modeling concentration polarization in crossflow membrane filtration based on the equivalence of osmotic pressure model and filtration theory. *J. Membr. Sci.* **145**, 223–241 (1998).
21. Bacchin, P., Meireles, M. & Aimar, P. Modelling of filtration: from the polarised layer to deposit formation and compaction. *Desalination* **145**, 139–146 (2002).
22. Croguennec, T., Renault, A., Beaufils, S., Dubois, J.-J. & Pezenec, S. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *J. Colloid Interface Sci.* **315**, 627–636 (2007).
23. Croguennec, T., Renault, A., Bouhallab, S. & Pezenec, S. Interfacial and foaming properties of sulfhydryl-modified bovine β -lactoglobulin. *J. Colloid Interface Sci.* **302**, 32–39 (2006).
24. Pignon, F. *et al.* Structure and rheological behavior of casein micelle suspensions during ultrafiltration process. *J. Chem. Phys.* **121**, 8138–8146 (2004).
25. David, C. *et al.* Spatial and Temporal in Situ Evolution of the Concentration Profile during Casein Micelle Ultrafiltration Probed by Small-Angle X-ray Scattering. *Langmuir* **24**, 4523–4529 (2008).
26. Alexander, M., Rojas-Ochoa, L. F., Leser, M. & Schurtenberger, P. Structure, dynamics, and optical properties of concentrated milk suspensions: an analogy to hard-sphere liquids. *J. Colloid Interface Sci.* **253**, 35–46 (2002).
27. Stradner, A. *et al.* Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature* **432**, 492–495 (2004).
28. Mezzenga, R., Schurtenberger, P., Burbidge, A. & Michel, M. Understanding foods as soft materials. *Nat Mater* **4**, 729–740 (2005).
29. Clermont, Y., Xia, L., Rambourg, A., Tuner, J. D. & Hermo, L. Transport of Casein Submicelles and Formation of Secretion Granules in the Golgi Apparatus of Epithelial Cells of the Lactating Mammary Gland of the Rat. *Anat. Rec.* **235**, 363–373 (1993).

30. De Kruif, C. G. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.* **81**, 3019–3028 (1998).
31. Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A. & Goff, H. D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *Int. Dairy J.* **14**, 1025–1031 (2004).
32. Dalgleish, D. G. On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements. *Soft Matter* **7**, 2265–2272 (2011).
33. De Kruif, C. G. Casein micelle interactions. *Int. Dairy J.* **9**, 183–188 (1999).
34. Tuinier, R. & De Kruif, C. G. Stability of casein micelles in milk. *J. Chem. Phys.* **117**, 1290–1295 (2002).
35. De Kruif, C. G. & Zhulina, E. B. k-casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **117**, 151–159 (1996).
36. Moitzi, C., Menzel, A., Schurtenberger, P. & Stradner, A. The pH Induced Sol-Gel Transition in Skim Milk Revisited. A Detailed Study Using Time-Resolved Light and X-ray Scattering Experiments. *Langmuir* **27**, 2195–2203 (2011).
37. McMahon, D. J. & Oommen, B. S. Supramolecular structure of the casein micelle. *J. Dairy Sci.* **91**, 1709–1721 (2008).
38. Holt, C., De Kruif, C. G., Tuinier, R. & Timmins, P. A. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **213**, 275–284 (2003).
39. Horne, D. S. Casein micelle structure: models and muddles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 148–153 (2006).
40. Dalgleish, D. G. The casein micelle and its reactivity. *Lait* **87**, 385–387 (2007).
41. Holt, C. Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.* **43**, 63–151 (1992).
42. Walstra, P. Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.* **9**, 189–192 (1999).
43. Horne, D. S. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.* **8**, 171–177 (1998).
44. Chang, J. *et al.* Structural and Thermodynamic Properties of Charged Silica Dispersions. *J. Phys. Chem.* **99**, 15993–16001 (1995).
45. Parsegian, V. A., Fuller, N. & Rand, R. P. Measured Work of Deformation and Repulsion of Lecithin Bilayers. *Proceeding Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2750–2754 (1979).
46. Torquato, S. & Stillinger, F. H. Jammed hard-particle packings: From Kepler to Bernal and beyond. *Rev. Mod. Phys.* **82**, 2633–2672 (2010).

47. Senff, H. & Richtering, W. Temperature sensitive microgel suspensions: Colloidal phase behavior and rheology of soft spheres. *J. Chem. Phys.* **111**, 1705–1711 (1999).
48. Cloitre, M., Borrega, R., Monti, F. & Leibler, L. Structure and flow of polyelectrolyte microgels: from suspensions to glasses. *Comptes Rendus Phys.* **4**, 221–230 (2003).
49. Menut, P., Seiffert, S., Sprakel, J. & Weitz, D. A. Does size matter? Elasticity of compressed suspensions of colloidal- and granular-scale microgels. *Soft Matter* **8**, 156–164 (2012).
50. Schaertl, W. & Sillescu, H. Brownian dynamics of polydisperse colloidal hard spheres: Equilibrium structures and random close packings. *J. Stat. Phys.* **77**, 1007–1025 (1994).
51. Mason, T. G., Bibette, J. & Weitz, D. A. Elasticity of Compressed Emulsions. *Phys. Rev. Lett.* **75**, 2051–2054 (1995).
52. Mason, T. G. *et al.* Osmotic pressure and viscoelastic shear moduli of concentrated emulsions. *Phys. Rev. E* **56**, 3150–3166 (1997).
53. Guo, L., Colby, R. H., Lusignan, C. P. & Howe, A. M. Physical Gelation of Gelatin Studied with Rheo-Optics. *Macromolecules* **36**, 10009–10020 (2003).
54. Dupont, D. *et al.* Topography of the Casein Micelle Surface by Surface Plasmon Resonance (SPR) Using a Selection of Specific Monoclonal Antibodies. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 8375–8384 (2011).
55. Kumosinski, T. F., Pessen, H., Farrell, H. M. & Brumberger, H. Determination of the quaternary structural states of bovine casein by small-angle X-ray scattering: Submicellar and micellar forms. *Arch. Biochem. Biophys.* **266**, 548–561 (1988).
56. De Kruif, C. G., Tuinier, R., Holt, C., Timmins, P. A. & Rollema, H. S. Physicochemical Study of k and b-Casein Dispersions and the Effect of Cross-Linking by Transglutaminase. *Langmuir* **18**, 4885–4891 (2002).
57. Shukla, A., Narayanan, T. & Zanchi, D. Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter* **5**, 2884–2888 (2009).
58. Marchin, S., Putaux, J. L., Pignon, F. & Léonil, J. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering/ultras-small-angle X-ray scattering. *J. Chem. Phys.* **126**, 045101–045110 (2007).
59. Mezzenga, R. & Fischer, P. The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. *Rep. Prog. Phys.* **76**, 46601 (2013).
60. Holt, C. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. *Int. Dairy J.* **60**, 2–13 (2016).
61. Ingham, B. *et al.* Solving the mystery of the internal structure of casein micelles. *Soft Matter* **11**, 2723–2725 (2015).
62. Ingham, B. *et al.* Revisiting the interpretation of casein micelle SAXS data. *Soft Matter* **12**, 6937–6953 (2016).

63. De Kruif, C. G. The structure of casein micelles: a review of small-angle scattering data. *J. Appl. Crystallogr.* **47**, 1479–1489 (2014).
64. Auvray, L., Cotton, J. P., Ober, R. & Taupin, C. Concentrated Winsor microemulsions : a small angle X-ray scattering study. *J. Phys. France* **45**, 913–928 (1984).
65. Trejo, R., Dokland, T., Jurat-Fuentes, J. & Harte, F. Cryo-transmission electron tomography of native casein micelles from bovine milk. *J. Dairy Sci.* **94**, 5770–5775 (2011).
66. HadjSadok, A., Pitkowski, A., Nicolai, T., Benyahia, L. & Moulai-Mostefa, N. Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocoll.* **22**, 1460–1466 (2008).
67. Wang, J. H. Theory of the Self-diffusion of Water in Protein Solutions. A New Method for Studying the Hydration and Shape of Protein Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4755–4763 (1954).
68. Wang, J. H., Anfinsen, C. B. & Polestra, F. M. The Self-diffusion Coefficients of Water and Ovalbumin in Aqueous Ovalbumin Solutions at 10°C. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4763–4765 (1954).
69. Jönsson, B., Wennerström, H., Nilsson, P. G. & Linse, P. Self-diffusion of small molecules in colloidal systems. *Colloid Polym. Sci.* **264**, 77–88 (1986).
70. Bessière, Y., Abidine, N. & Bacchin, P. Low fouling conditions in dead-end filtration: Evidence for a critical filtered volume and interpretation using critical osmotic pressure. *J. Membr. Sci.* **264**, 37–47 (2005).
71. Happel, J. Viscous flow in multiparticle systems: Slow motion of fluids relative to beds of spherical particles. *AIChE J.* **4**, 197–201 (1958).
72. Abade, G. C., Cichocki, B., Ekiel-Jezewska, M. L., Nagele, G. & Wajnryb, E. Dynamics of permeable particles in concentrated suspensions. *Phys. Rev. E* **81**, 20404 (2010).
73. Uricanu, V. I., Duits, M. H. G. & Mellema, J. Hierarchical Networks of Casein Proteins: An Elasticity Study Based on Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **20**, 5079–5090 (2004).
74. Helstad, K., Rayner, M., van Vliet, T., Paulsson, M. & Dejmek, P. Liquid droplet-like behaviour of whole casein aggregates adsorbed on graphite studied by nanoindentation with AFM. *Food Hydrocoll.* **21**, 726–738 (2007).
75. Stuhrmann, H. Neutron small-angle scattering of biological macromolecules in solution. *J. Appl. Crystallogr.* **7**, 173–178 (1974).
76. Stuhrmann, H. B. & Duee, E. D. The determination of the scattering density distribution of polydisperse solutions by contrast variation: a neutron scattering study of ferritin. *J. Appl. Crystallogr.* **8**, 538–542 (1975).
77. de Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S. & Petukhov, A. V. Casein micelles and their internal structure. *AdvColloid Interface Sci* **171–172**, 36–52 (2012).

78. Grey, M. *et al.* Acceleration of α -Synuclein Aggregation by Exosomes. *J. Biol. Chem.* **290**, 2969–2982 (2015).
79. Stradner, A., Cardinaux, F. & Schurtenberger, P. A Small-Angle Scattering Study on Equilibrium Clusters in Lysozyme Solutions. *J. Phys. Chem. B* **110**, 21222–21231 (2006).
80. Shukla, A. *et al.* Absence of equilibrium cluster phase in concentrated lysozyme solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5075–5080 (2008).
81. Nir, O., Trieu, T., Bannwarth, S. & Wessling, M. Microfiltration of deformable microgels. *Soft Matter* **12**, 6512–6517 (2016).
82. Hwang, K. J., Wang, Y. T., Iritani, E. & Katagiri, N. Effect of gel particle softness on the performance of cross-flow microfiltration. *J. Membr. Sci.* **365**, 130–137 (2010).
83. Linkhorst, J., Beckmann, T., Go, D., Kuehne, A. J. C. & Wessling, M. Microfluidic colloid filtration. *Sci. Rep.* **6**, 22376 (2016).
84. Stenekes, R. J. H., Franssen, O., van Bommel, E. M. G., Crommelin, D. J. A. & Hennink, W. E. The use of aqueous PEG/dextran phase separation for the preparation of dextran microspheres. *Int. J. Pharm.* **183**, 29–32 (1999).
85. Stenekes, R. J. H., Franssen, O., Bommel, E. M. G. van, Crommelin, D. J. A. & Hennink, W. E. The Preparation of Dextran Microspheres in an All-Aqueous System: Effect of the Formulation Parameters on Particle Characteristics. *Pharm. Res.* **15**, 557–561 (1998).
86. Agbangla, G. C., Climent, É. & Bacchin, P. Experimental investigation of pore clogging by microparticles: Evidence for a critical flux density of particle yielding arches and deposits. *Sep. Purif. Technol.* **101**, 42–48 (2012).
87. Bacchin, P., Marty, A., Duru, P., Meireles, M. & Aimar, P. Colloidal surface interactions and membrane fouling: Investigations at pore scale. *Adv. Colloid Interface Sci.* **164**, 2–11 (2011).
88. Laar, T. van de, Klooster, S. ten, Schroën, K. & Sprakel, J. Transition-state theory predicts clogging at the microscale. *Sci. Rep.* **6**, 28450 (2016).
89. Krebs, T., Schroën, K. & Boom, R. Coalescence dynamics of surfactant-stabilized emulsions studied with microfluidics. *Soft Matter* **8**, 10650–10657 (2012).
90. Straathof, A. J. J. Transformation of Biomass into Commodity Chemicals Using Enzymes or Cells. *Chem. Rev.* (2013).
91. Guerriero, G., Hausman, J.-F., Strauss, J., Ertan, H. & Siddiqui, K. S. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Eng. Life Sci.* n/a-n/a (2015). doi:10.1002/elsc.201400196
92. Himmel, M. E. *et al.* Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* **315**, 804–807 (2007).

93. Zhao, X., Zhang, L. & Liu, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **6**, 465–482 (2012).
94. Bayer, E. A., Belaich, J.-P., Shoham, Y. & Lamed, R. The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 521–554 (2004).
95. Saha, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 279–291 (2003).
96. Sun, S., Sun, S., Cao, X. & Sun, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* **199**, 49–58 (2016).
97. Li, L.-L., McCorkle, S. R., Monchy, S., Taghavi, S. & van der Lelie, D. Bioprospecting metagenomes: glycosyl hydrolases for converting biomass. *Biotechnol. Biofuels* **2**, 10 (2009).
98. Abot, A. *et al.* CAZyChip: dynamic assessment of exploration of glycoside hydrolases in microbial ecosystems. *BMC Genomics* **17**, (2016).
99. Paës, G., Berrin, J.-G. & Beaugrand, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol. Adv.* **30**, 564–592 (2012).
100. Cantarel, B. L. *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, D233–D238 (2009).
101. Lee, Y.-J. *et al.* Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour. Technol.* **99**, 378–386 (2008).
102. Vardakou, M. *et al.* Understanding the Structural Basis for Substrate and Inhibitor Recognition in Eukaryotic GH11 Xylanases. *J. Mol. Biol.* **375**, 1293–1305 (2008).
103. Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. & Davies, G. J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382**, 769–781 (2004).
104. Vuong, T. V. & Master, E. R. Fusion of a Xylan-Binding Module to Gluco-Oligosaccharide Oxidase Increases Activity and Promotes Stable Immobilization. *PLoS ONE* **9**, e95170 (2014).
105. Reyes-Ortiz, V. *et al.* Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 93 (2013).
106. Hervé, C. *et al.* Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15293–15298 (2010).
107. Kittur, F. S. *et al.* Fusion of family 2b carbohydrate-binding module increases the catalytic activity of a xylanase from *Thermotoga maritima* to soluble xylan. *FEBS Lett.* **549**, 147–151 (2003).
108. Hidayat, B. J., Felby, C., Johansen, K. S. & Thygesen, L. G. Cellulose is not just cellulose: a review of dislocations as reactive sites in the enzymatic hydrolysis of cellulose microfibrils. *Cellulose* **19**, 1481–1493 (2012).

109. Zhang, X. *et al.* Understanding How the Complex Molecular Architecture of Mannan-degrading Hydrolases Contributes to Plant Cell Wall Degradation. *J. Biol. Chem.* **289**, 2002–2012 (2014).
110. Igarashi, K. *et al.* High Speed Atomic Force Microscopy Visualizes Processive Movement of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I on Crystalline Cellulose. *J. Biol. Chem.* **284**, 36186–36190 (2009).
111. Nordgren, N., Eklöf, J., Zhou, Q., Brumer, H. & Rutland, M. W. Top-Down Grafting of Xyloglucan to Gold Monitored by QCM-D and AFM: Enzymatic Activity and Interactions with Cellulose. *Biomacromolecules* **9**, 942–948 (2008).
112. Penttilä, P. A. *et al.* Changes in Submicrometer Structure of Enzymatically Hydrolyzed Microcrystalline Cellulose. *Biomacromolecules* **11**, 1111–1117 (2010).
113. Kent, M. S. *et al.* Study of Enzymatic Digestion of Cellulose by Small Angle Neutron Scattering. *Biomacromolecules* **11**, 357–368 (2010).
114. Turon, X., Rojas, O. J. & Deinhammer, R. S. Enzymatic Kinetics of Cellulose Hydrolysis: A QCM-D Study. *Langmuir* **24**, 3880–3887 (2008).
115. Jean, B., Dubreuil, F., Heux, L. & Cousin, F. Structural Details of Cellulose Nanocrystals/Polyelectrolytes Multilayers Probed by Neutron Reflectivity and AFM. *Langmuir* **24**, 3452–3458 (2008).
116. Elazzouzi-Hafraoui, S., Putaux, J.-L. & Heux, L. Self-assembling and Chiral Nematic Properties of Organophilic Cellulose Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **113**, 11069–11075 (2009).
117. Cerclier, C. *et al.* Coloured Semi-reflective Thin Films for Biomass-hydrolyzing Enzyme Detection. *Adv. Mater.* **23**, 3791–3795 (2011).
118. Dammak, A. *et al.* Exploring Architecture of Xyloglucan Cellulose Nanocrystal Complexes through Enzyme Susceptibility at Different Adsorption Regimes. *Biomacromolecules* **16**, 589–596 (2015).
119. Cerclier, C. V. *et al.* Xyloglucan-Cellulose Nanocrystal Multilayered Films: Effect of Film Architecture on Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules* (2013).
120. Paës, G. & Chabbert, B. Characterization of Arabinoxylan/Cellulose Nanocrystals Gels to Investigate Fluorescent Probes Mobility in Bioinspired Models of Plant Secondary Cell Wall. *Biomacromolecules* **13**, 206–214 (2012).
121. Paës, G. *et al.* Modeling Progression of Fluorescent Probes in Bioinspired Lignocellulosic Assemblies. *Biomacromolecules* **14**, 2196–2205 (2013).
122. Dumon, C., Song, L., Bozonnet, S., Fauré, R. & O'Donohue, M. J. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. *Process Biochem.* **47**, 346–357 (2012).
123. Kohnke, T., Ostlund, A. & Brelid, H. Adsorption of Arabinoxylan on Cellulosic Surfaces: Influence of Degree of Substitution and Substitution Pattern on Adsorption Characteristics. *Biomacromolecules* **12**, 2633–2641 (2011).

124. Bolam, D. N. *et al.* Evidence for Synergy between Family 2b Carbohydrate Binding Modules in *Cellulomonas fimi* Xylanase 11A. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 2468–2477 (2001).
125. Hoeger, I. C. *et al.* Bicomponent Lignocellulose Thin Films to Study the Role of Surface Lignin in Cellulolytic Reactions. *Biomacromolecules* **13**, 3228–3240 (2012).
126. Martin-Sampedro, R. *et al.* Preferential Adsorption and Activity of Monocomponent Cellulases on Lignocellulose Thin Films with Varying Lignin Content. *Biomacromolecules* **14**, 1231–1239 (2013).
127. Arcot, L. R., Lundahl, M., Rojas, O. J. & Laine, J. Asymmetric cellulose nanocrystals: thiolation of reducing end groups via NHS–EDC coupling. *Cellulose* **21**, 4209–4218 (2014).
128. McCleary, B. V. & McGeough, P. A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- β -Xylanase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **177**, 1152–1163 (2015).
129. Du, R. *et al.* Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: SEC-MALLS analysis and reaction mechanism. *RSC Adv.* **3**, 1871–1877 (2013).
130. van der Kooij, H. M., Fokink, R., van der Gucht, J. & Sprakel, J. Quantitative imaging of heterogeneous dynamics in drying and aging paints. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
131. Muller, F. *et al.* Mechanism of Associations of Neutral Semiflexible Biopolymers in Water: The Xyloglucan Case Reveals Inherent Links. *Macromol. Chem. Phys.* **214**, 2312–2323 (2013).
132. Muller, F. *et al.* SANS Measurements of Semiflexible Xyloglucan Polysaccharide Chains in Water Reveal Their Self-Avoiding Statistics. *Biomacromolecules* **12**, 3330–3336 (2011).
133. de Gennes, P.-G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. (Cornell University Press, 1979).
134. Barakat, A., Putaux, J.-L., Saulnier, L., Chabbert, B. & Cathala, B. Characterization of Arabinoxylan–Dehydrogenation Polymer (Synthetic Lignin Polymer) Nanoparticles. *Biomacromolecules* **8**, 1236–1245 (2007).
135. Barakat, A. *et al.* Supramolecular Organization of Heteroxylan–Dehydrogenation Polymers (Synthetic Lignin) Nanoparticles. *Biomacromolecules* **9**, 487–493 (2008).
136. Barakat, A. *et al.* Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins formed by bulk and end-wise polymerization: a model study of lignin carbohydrate complex formation. *Planta* **226**, 267–281 (2007).

Annexes

- A Curriculum vitæ
- B Autres produits de la recherche : séminaires, publications à diffusion restreinte
- C Copie de 5 publications significatives
 - C-1 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2009
 - C-2 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2010
 - C-3 Ouanezar et al., Langmuir, 2012
 - C-4 Bouchoux et al., Langmuir, 2014
 - C-5 Pasquier et al., Physical Chemistry Chemical Physics, 2016

Annexe A
Curriculum vitæ

Antoine BOUCHOUX

39 ans

Nationalité française

Pacsé, 2 enfants (6 et 8 ans)

Chargé de recherche 1^{ère} classe

INRA, Institut National de la Recherche Agronomique

Département CEPIA, Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture

LISBP, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSA

135 avenue de Rangueil

31077 Toulouse cedex 04, France

Tél. : 05.61.55.97.74 / Mob. : 06.10.88.65.66

Email : antoine.bouchoux@insa-toulouse.fr

Parcours universitaire

2001 Diplôme d'Ingénieur des Industries Chimiques, INPL, ENSIC, Nancy

2001 Diplôme d'Etudes Approfondies en Génie des procédés, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC), Nancy

2004 Doctorat de Génie des Procédés, Université Paul Sabatier, Toulouse

Parcours professionnel

2005 Séjour Postdoctoral. Belfort's Biomolecular Separations Research Group, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA

Au cours de ce séjour, j'ai contribué à un vaste projet de recherche visant à mieux comprendre les phénomènes de translocation de protéines à travers le NPC (Nuclear Pore Complex), principal médiateur de transport entre le noyau et le cytoplasme des cellules eucaryotes. Mon travail a consisté à mesurer par microscopie à force atomique (AFM) certaines des forces d'interactions protéines-protéines mises en jeu lors de cette translocation.

2006-2013 Chargé de Recherche INRA. Laboratoire Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO, UMR 1253 INRA-AGROCAMPUS OUEST), Rennes

[Accueilli d'oct. 2011 à oct. 2013 au Laboratoire de Génie Chimique, Toulouse]

L'objectif principal de mes recherches au STLO était de mieux comprendre les phénomènes de transfert impliqués dans la filtration d'un lait écrémé. J'ai pour cela développé une approche relevant de la physico-chimie et de la physique de la matière molle, visant à caractériser le comportement de la micelle de caséine - composé principal du lait - en cours de filtration et aux fortes concentrations : résistance à la compression, transition de phase, interactions. Au cours de cette période, j'ai également travaillé à l'élucidation de la structure de la micelle de caséine par des moyens physiques (rayons X, neutrons, AFM). J'ai aussi participé à des recherches visant à comprendre le comportement générique des protéines en milieu dense et confiné.

Oct. 2013 Chargé de recherche INRA. Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP, UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSA), Toulouse

Le contexte général de mes recherches au LISBP est la valorisation de la biomasse lignocellulosique en composés à haute valeur ajoutée : carburant, synthons. Je m'intéresse aux procédés enzymatiques de dégradation de la biomasse, et cherche à mieux comprendre comment les enzymes dégradent leur substrat et en quoi l'efficacité de la dégradation est liée aux propriétés du substrat (composition, teneur en eau) et/ou celles de l'enzyme (structure, propriétés physico-chimiques). En lien avec des collègues physiciens et enzymologistes, je développe des approches expérimentales visant à "saisir l'enzyme au travail" dans des situations de fonctionnement réalistes, cad sur substrat naturel ou dans des situations modèles reproduisant une ou plusieurs caractéristique(s) d'un substrat complexe. De premiers travaux concernent par exemple le suivi de la dégradation enzymatique de films modèles d'une hémicellulose par microbalance à cristal de quartz (QCM). De façon parallèle, je continue de m'intéresser aux processus de filtration et de compression d'objets déformables et poreux, en rapport avec mes recherches antérieures. Je participe à ce titre au co-encadrement d'une thèse avec M. Meireles (LGC, Toulouse).

Production scientifique

16 publications dans des revues internationales à comité de lecture
3 publications dans des revues nationales à comité de lecture
27 communications orales dans des congrès et colloques internationaux (12) et nationaux (15)
23 posters dans des congrès et colloques internationaux (18) et nationaux (5)
Profils ResearcherID et Google Scholar :
<http://www.researcherid.com/rid/E-9111-2010>
<http://scholar.google.fr/citations?user=B30sftYAAAAJ>

Activités d'enseignement et d'encadrement

3 codirections de thèses
1 co-encadrement de séjour postdoctoral
Encadrement et co-encadrement de 14 stagiaires Master et Ingénieurs depuis 2006
Enseignement en Génie des Procédés : ≈ 70 heures TP en 2004

Autres activités et animations scientifiques

Membre du GDR CNRS 2980 "Approches Multi-physiques pour les systèmes Colloïdaux Concentrés" depuis 2008
Rapporteur pour des revues internationales dont Journal of Membrane Science (15), Separation & Purification Technology (4), Langmuir (2), Food Hydrocolloids (2), Pharmaceutical Research (1), Soft Matter (1), International Dairy Journal (1)
Responsable d'un équipement de microscopie à force atomique au STLO de nov. 2009 à oct. 2011
Co-organisateur des séminaires internes du LISBP depuis janv. 2017
Co-fondateur du Club Lignocellulose en 2015 au LISBP
Responsable du thème *Milieus poreux et colloïdes* au sein de la fédération de recherche FERMaT (Fluides, énergie, réacteurs, matériaux et transferts) sur Toulouse, depuis janv. 2017

Annexe B

Autres produits de la recherche^e

Communications dans des congrès et colloques

Communication orales

Posters

Séminaires et autres communications orales

Produits et documents destinés à des utilisateurs de la recherche et/ou un public plus large

^eLes articles publiés dans des revues à comité de lecture sont listés en partie 1.2

Communications dans des congrès et colloques

Communication orales

- C27 *A general approach for predicting the filtration of soft and permeable colloids: the Milk example*
A. Bouchoux, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou^f
Euromembrane 2015, 06-10 sept. 2015, Aachen, DE
- C26 *Understanding the behavior of deformable and porous microparticles in filtration: a microfluidic approach*
I. Bouhid de Aguiar, F. Lange, M. Meireles, **A. Bouchoux**
European Conference on Fluid-Particle Separation, 15-17 octobre 2014, Lyon, FR
- C25 *Equations d'état de solutions hautement concentrées de lysozyme*
C. Pasquier, S. Pezennec, **A. Bouchoux**, B. Cabane, M. Lund, S. Rigault, S. Beauvils
6^{èmes} Rencontres Biologie-Physique du Grand Ouest, 3-4 juin 2014, Le Mans, FR
- C24 *In-Situ characterization by small angle x-ray scattering (SAXS) of accumulated layers during ultrafiltration of casein micelles dispersions*
G. Gésan-Guiziou, F. Pignon, C. David, **A. Bouchoux**, J. Perez
International Membrane Science & Technology Conference, 26-29 nov. 2013, Melbourne, AU
- C23 *Modeling the filtration of soft and permeable colloids: the milk case study*
A. Bouchoux, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou
14^{ème} congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 8-10 oct. 2013, Lyon, FR
- C22 *Modélisation de la filtration de colloïdes mous et déformables: Cas du lait*
A. Bouchoux, P. Qu, P. Bacchin, G. Gésan-Guiziou
Colloque commun des sections Ouest du GFP (Groupement Français des Polymères) et de la SFGP (Société Française de Génie des Procédés), 15-17 mai 2013, Nantes, FR
- C21 *Probing the diffusional and structural properties of casein micelles dispersions through Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP): From the dilute to the highly concentrated/crowded regime*
P. De Sa Peixoto, J. Floury, **A. Bouchoux**, M.-N. Madec, G. Gésan-Guiziou
6th International Symposium on Food Rheology and Structure, 10-13 avril 2012, Zurich, CH
- C20 *Modeling the filtration of deformable and permeable colloidal particles: the case of casein micelles*
P. Qu, G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**
International Congress on Membranes and Membrane Processes 2011, 23-29 juillet 2011, Amsterdam, NL

^fLe nom de l'orateur est souligné

- C19 *Casein micelle internal structure: a sponge model*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, J. Pérez, B. Cabane
 5^{es} Rencontres Biologie-Physique du Grand Ouest, 9-10 juin 2011, Rennes, FR
- C18 *Apport de la microscopie à force atomique (AFM) à l'étude d'un objet colloïdal naturel : la micelle de caséine*
M. Ouanezar, F. Guyomarc'h, **A. Bouchoux**
 5^{es} Rencontres Biologie-Physique du Grand Ouest, 9-10 juin 2011, Rennes, FR
- C17 *Compression osmotique de protéines globulaires : interactions aux concentrations élevées*
S. Rigault, **A. Bouchoux**, S. Beaufils, S. Pézenec
 5^{es} Rencontres Biologie-Physique du Grand Ouest, 9-10 juin 2011, Rennes, FR
- C16 *What cohesive forces are involved in the gelation of casein micelle dispersions at high concentration?*
P. Qu, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou
 Biopolymères' 2010, 1-3 déc. 2010, Le Croisic, FR
- C15 *NMR water relaxation and self-diffusion in highly concentrated casein systems*
 D. Schorr, M. Cambert, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou, F. Mariette
 Biopolymères' 2010, 1-3 déc. 2010, Le Croisic, FR
- C14 *Impact de la force ionique en filtration de lait : analyse des caractéristiques des micelles de caséines et des dépôts*
G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**, A. Jimenez-Lopez, F. Garnier-Lambrouin
 12^{ème} congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 14-16 oct. 2009, Marseille, FR
- C13 *Ionic strength impact in filtration of skimmed milk: analysis of casein micelles and deposit properties*
G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**, A. Jimenez-Lopez, F. Garnier-Lambrouin
 Euromembrane 2009, 6-10 sept. 2009, Montpellier, FR
- C12 *Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions*
A. Bouchoux, B. Debbou, G. Gésan-Guiziou, M.H. Famelart, J.L. Doublier, B. Cabane
 5th International Symposium on Food Rheology and Structure, 15-18 juin 2009, Zurich, CH
- C10 *Casein dispersions under osmotic stress: the impact of structure and mineral composition*
A. Bouchoux, P.E. Cayemitte, J. Jardin, G. Gésan-Guiziou, B. Cabane
 1st International Symposium on Minerals and Dairy Products, 1-3 oct. 2008, St-Malo, FR
- C9 *Pressure effects in dead-end filtration of skimmed milk: Analysis of cake properties*
A. Bouchoux, F. Garnier, A. Haroun, G. Gésan-Guiziou
 6th European Congress of Chemical Engineering, 16-20 sept. 2007, Copenhagen, DK

- C8 *Rôle de la composition ionique sur la rétention de sucres et d'acides organiques en nanofiltration: intensification des procédés*
H. Roux-de Balmann, B. Chaufer, B. Balannec, **A. Bouchoux**, M. Vourch
 Colloque GIS INRA-CNRS Prosetia, 13-14 mars 2006, Paris, FR
- C7 *Key components for transport through the nuclear pore complex (Npc): mechanisms involved during binding between specific Karyopherins and Fg-Nups*
A. Dutta, **A. Bouchoux**, G. Belfort
 2005 American Institute of Chemical Engineers Annual Meeting, 30 oct. - 4 nov. 2005, Cincinnati, USA
- C6 *Sélectivité de la nanofiltration pour l'intensification des procédés : mécanismes de rétention des sucres et des acides organiques*
B. Chaufer, H. Roux de Balmann, **A. Bouchoux**, O. Froidure-Lahrer, B. Balannec, M. Rabiller-Baudry
 Colloque CIS INRA-CNRS Prosetia, 14-15 mars 2005, Villeneuve d'Ascq, FR
- C5 *Introduction of nanofiltration in a production process of fermented organic acids*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 World Filtration Congress 9, 18-24 avril 2004, New Orleans, USA
- C4 *Etude des mécanismes de sélectivité en nanofiltration en vue de l'intensification des procédés*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, M. Vourch, B. Balannec, B. Chaufer, G. Dorange, F. Lutin
 Colloque GIS INRA-CNRS Prosetia, 22-23 mars 2004, Toulouse, FR
- C3 *Evaluation of nanofiltration for the purification of an organic acid fermentation broth*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 9th International Congress on Engineering and Food, 7-11 mars 2004, Montpellier, FR
 Communication orale
- C2 *Etude de la nanofiltration pour son introduction dans un procédé de production d'acides organiques*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 Colloque GIS INRA-CNRS Prosetia, 19-20 mars 2003, Rennes, FR
- C1 *Intégration de la nanofiltration dans les procédés de production d'acides organiques alimentaires*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 Colloque GIS INRA-CNRS Prosetia, 19-20 mars 2002, Compiègne, FR

Posters

- P23 *Membrane filtration of soft and permeable objects: the quest for general rules and guidelines*
I. Bouhid de Aguiar, M. Meireles, **A. Bouchoux**
Euromembrane 2015, 06-10 sept. 2015, Aachen, DE
- P22 *Compressive behaviour of micrometer-sized methacrylated dextran microgels*
I. Bouhid de Aguiar, M. Meireles, **A. Bouchoux**
5th International Colloids Conference, 21-24 juin 2015, Amsterdam, NL
- P21 *How to quantify enzyme activity and kinetics in non-bulk systems? An example through the enzymatic hydrolysis of hemicellulose thin films*
A. Zeidi, L. Dianteill, C. Dumon, C. Montanier, R. Fauré, J. Morchain, N. Lebaz, C. Séverac, **A. Bouchoux**
The CBM11 - 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 10-13 mai 2015, Espoo, FI
- P20 *Importance of water flux through protein interfacial films as revealed by neutron reflectometry on lysozyme and ovalbumin layers*
S. Pezennec, L.-T. Lee, **A. Bouchoux**, B. Cabane, C. Pasquier, M. Pasco, S. Beaufils
Neutrons and Food, 9-11 juillet 2014, Paris, FR
- P19 *Extensive molecular trapping of non-sticky probes within casein microgels*
P. De Sa Peixoto, G. Gésan-Guizieu, D. Thomas, M. Schmutz, **A. Bouchoux**
International Soft Matter Conference 2013, 15-19 sept. 2013, Rome, IT
- P18 *Dead-end filtration of sponge-like colloids: The case of casein micelle*
P. Qu, G. Gésan-Guizieu, **A. Bouchoux**
Euromembrane 2012, 23-27 sept. 2012, Londres, UK
- P17 *Equation of state and structure of highly concentrated globular protein solutions*
C. C. Pasquier, S. Beaufils, **A. Bouchoux**, B. Cabane, S. Rigault, J. Perez, V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, G. Paboeuf, M. Pasco, S. Pezennec
26th Conference of the European Colloid and Interface Society, 2-7 sept. 2012, Lund, SE
- P16 *Structure d'un colloïde naturel: la micelle de caséine du lait*
M. Ouanezar, F. Guyomarc'h, **A. Bouchoux**
Forum des Microscopies à Sonde Locale, 12-16 mars 2012, St-Jacut-de-la-Mer, FR
- P15 *Modeling the filtration of deformable and permeable colloidal particles: the case of casein micelles*
P. Qu, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guizieu
13^{ème} congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 29 nov.-1 dec. 2011, Lille, FR

- P14 *High-resolution imaging of milk casein micelles*
M. Ouanezar, F. Guyomarc'h, **A. Bouchoux**
AFM BioMed Conference, 23-27 août 2011, Paris, FR
- P13 *On the determination of a critical osmotic pressure from the filtration of compressible soft colloids*
P. Qu, G. Gésan-Guizieu, **A. Bouchoux**
International Congress on Membranes and Membrane Processes 2011, 23-29 juillet 2011, Amsterdam, NL
- P12 *NMR water relaxation and self-diffusion in highly concentrated casein systems*
D. Schorr, M. Cambert, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guizieu, F. Mariette
10th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science, 13-15 sept. 2010, Clermont-Ferrand, FR
- P11 *Casein micelles as sticky colloidal microgel particles*
A. Bouchoux, P.E. Cayemitte, B. Debbou, G. Gésan-Guizieu, M.H. Famelart, J.L. Doublier, B. Cabane
24th Conference of the European Colloid and Interface Society, 5-10 sept. 2010, Prague, CZ
- P10 *Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions*
A. Bouchoux, B. Debbou, G. Gésan-Guizieu, M.H. Famelart, J.L. Doublier, B. Cabane
de Gennes Discussion Conference, 2-5 fév. 2009, Chamonix, FR
- P9 *Osmotic Compression of Casein Micelle Dispersions*
A. Bouchoux, P.E. Cayemitte, J. Jardin, G. Gésan-Guizieu, B. Cabane
Food Colloids 2008, 6-9 avril 2008, Le Mans, FR
- P8 *Interactions between nucleoporins and karyopherins using a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring with relevance to transport across the nuclear pore complex*
A. Dutta, J. Novatt, T. Jovanovic, **A. Bouchoux**, A.S. McKenney, M.P. Rout, B.T. Chait, G. Belfort
51st Annual Meeting of the Biophysical Society, 3-7 mars 2007, Baltimore, USA
- P7 *Properties of accumulated matter in dead-end ultrafiltration of casein micelles solutions*
G. Gésan-Guizieu, **A. Bouchoux**, A. Jimenez, C. Arcelin
2nd European Conference on Filtration and Separation, 12-13 oct. 2006, Compiègne, FR
- P6 *Towards a better understanding of transport through nuclear pore complex: preparation and characterization of specific nucleoporins (FG-Nups) SAMs*
A. Bouchoux, A. Dutta, G. Belfort
230th American Chemical Society Annual Meeting, 28 août - 1er sept. 2005, Washington, USA

- P5 *Effect of solute-solute interactions on nanofiltration selectivity*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 North American Membranes Society Annual Meeting 2005, 11-15 juin 2005, Providence, USA
- P4 *Experimental approach of nanofiltration as a purification step in a production process of organic acids*
 A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 4th European Congress of Chemical Engineering, 21-25 sept. 2003, Grenade, ES
- P3 *Evaluation de la nanofiltration pour son intégration dans un procédé de production d'acides organiques*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 9ème congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 9-11 sept. 2003, St-Nazaire, FR
- P2 *Evaluation de la nanofiltration pour son intégration dans un procédé de production d'acides organiques reposant sur une étape d'électrodialyse à membranes bipolaires*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 Colloque francophone MemPro2, 14-16 mai 2003, Montpellier, FR
- P1 *Integration of nanofiltration in production processes of fermented organic acids*
A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 International Congress on Membranes and Membrane Processes 2002, 8-12 juillet 2002, Toulouse, FR

Séminaires et autres communications orales

- S31 *Etude des cinétiques enzymatiques au niveau des interfaces et en milieu confiné : le cas de la biomasse lignocellulosique*
L. Dianteill, C. Dumon, **A. Bouchoux**
Journées du GDR 2980 AMC2, 14-15 nov. 2016, Banyuls-sur-Mer, FR
- S30 *Diffusion de rayonnement aux petits angles (SAXS, SANS) : principe, instrumentation, applications*
A. Bouchoux
Séminaire interne du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, 28 janv. 2016, Toulouse, FR
- S29 *Interactions dans des films d'adsorption de protéines globulaires à l'interface eau-air: comportements différenciés et effets d'ions*
S. Pézennec, C. Pasquier, S. Beauvils, L.-T. Lee, **A. Bouchoux**, V. Lechevalier, B. Cabane
Journées du GDR 2980 AMC2, 26-27 oct. 2015, Carry-Le-Rouet, FR
- S28 *Equations d'état expérimentales du lysozyme*
C. Pasquier, S. Beauvils, **A. Bouchoux**, S. Rigault, B. Cabane, M. Lund, V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, M. Pasco, G. Paboeuf, J. Pérez, S. Pézenne
Journées du GDR 2980 AMC2, 26-27 oct. 2015, Carry-Le-Rouet, FR
- S27 *Compressive behavior of polydisperse suspensions of permeable and deformable microgels*
I. Bouhid de Aguiar, M. Meireles, **A. Bouchoux**
Journées du GDR 2980 AMC2, 26-27 oct. 2015, Carry-Le-Rouet, FR
- S26 *Synthesis and characterization of deformable and porous microparticles*
I. Bouhid de Aguiar, F. Lange, M. Meireles, **A. Bouchoux**
Journées du GDR 2980 AMC2, 19-21 oct. 2014, Carcans, FR
- S25 *Micelle de caséine, SANS, et variation de contraste*
A. Bouchoux, J. Ventureira, F. Lambrouin, G. Gésan-Guizieu, P. Qu, C. Pasquier, S. Pézenne, R. Schweins, B. Cabane
Journées du GDR 2980 AMC2, 15-16 oct. 2012, Rueil-Malmaison, FR
- S24 *Equation d'état et structure de solutions de protéines globulaires hautement concentrées*
C. Pasquier, S. Rigault, **A. Bouchoux**, S. Beauvils, S. Pézenne, B. Cabane
Journées du GDR 2980 AMC2, 15-16 oct. 2012, Rueil-Malmaison, FR
- S23 *Probing the diffusional and structural properties of casein micelles dispersions*
P. De Sa Peixoto, **A. Bouchoux**, J. Floury, M.-N. Madec, G. Gésan-Guizieu
Journées du GDR 2980 AMC2, 15-16 oct. 2012, Rueil-Malmaison, FR

- S22 *Assemblages protéiques colloïdaux sous compression osmotique : interactions, structuration, et procédés*
A. Bouchoux
 Séminaire interne du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, 19 janv. 2012, Toulouse, FR
- S21 *Assemblages protéiques colloïdaux sous compression osmotique : interactions, structuration, et procédés*
A. Bouchoux
 Séminaire interne du Laboratoire de Génie Chimique, 12 janv. 2012, Toulouse, FR
- S20 *Modélisation de la filtration de colloïdes déformables et perméables : cas des micelles de caséine*
P. Qu, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou
 Journées du GDR 2980 AMC2, 13-14 oct. 2011, Toulouse, FR
- S19 *Compression osmotique de protéines globulaires: interactions aux concentrations élevées*
 S. Rigault, **A. Bouchoux**, S. Beaufils, **S. Pezennec**
 Journées du GDR 2980 AMC2, 13-14 oct. 2011, Toulouse, FR
- S18 *Regonflement de gels de micelles de caséine*
P. Qu, **A. Bouchoux**, G. Gésan-Guiziou
 Journées du GDR 2980 AMC2, 12-14 décembre 2010, Annecy, FR
- S17 *Structure de la micelle de caséine sous compression osmotique*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, J. Pérez, B. Cabane
 Journées du GDR 2980 AMC2, 12-14 décembre 2010, Annecy, FR
- S16 *Structure de la micelle de caséine : nouvelle proposition*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, J. Pérez, B. Cabane
 Séminaire interne du laboratoire STLO, 29 nov.2010, Rennes, FR
- S15 *AFM et agroalimentaire*
V. Lechevalier, C. Le Floch-Fouéré, F. Guyomarc'h, **A. Bouchoux**
 Journées Microscopie Champ Proche Bretagne, 28-29 juin 2010, Rennes, FR
- S14 *Microscopie à force atomique à l'INRA de Rennes : appareillage et premiers développements*
A. Bouchoux, F. Guyomarc'h
 Journées Microscopie Champ Proche Bretagne, 28-29 juin 2010, Rennes, FR
- S13 *Microscopie à force atomique*
A. Bouchoux, **F. Guyomarc'h**, G. Jan
 Séminaire interne du laboratoire STLO, 05 fév.2010, Rennes, FR

- S12 *Caractérisation par SAXS des profils de concentration de micelles à la surface des membranes lors de la filtration de lait*
G. Gésan-Guiziou, **A. Bouchoux**, F. Pignon, C. David, J. Perez
 Journée INRA-SOLEIL, 13 nov. 2009, Gif sur Yvette, FR
- S11 *La micelle de caséine sous compression osmotique: structure, interactions, rhéologie*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, P-E. Cayemitte, B. Debbou, J. Jardin, M.-H. Famelart, J.-L. Doublier, B. Cabane
 Journées du GDR 2980 Prosurf, 06-07 juillet 2009, Sorèze, FR
- S10 *La micelle de caséine sous compression osmotique: structure, interactions, rhéologie*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, P-E. Cayemitte, B. Debbou, J. Jardin, M.-H. Famelart, J.-L. Doublier, B. Cabane
 Journée projet ANR ECOPROM "Mécanismes et Modélisation / Filtration / Protéines laitières", 29 juin 2009, Rennes, FR
- S9 *Pression osmotique de dispersions de micelle : stress osmotique et séchage par désorption*
A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, P. Schuck, B. Cabane
 Journée du GDR 2980 Prosurf, 17 oct. 2008, Toulouse, FR
- S8 *La micelle de caséine sous stress osmotique: 3 régimes de compression*
A. Bouchoux, B. Cabane, P-E. Cayemitte, J. Jardin, G. Gésan-Guiziou
 Journées du GDR 2980 ProSurf, 19-20 juin 2008, Carry-le-Rouet, FR
- S7 *Mesures de forces par AFM: principe et exemples*
A. Bouchoux
 Journée transversalité INRA SFBA (Séparation des Fluides Biologiques et Alimentaires), 19 déc. 2006, Paris, FR
- S6 *Ultra- et Microfiltration d'un lait écrémé : de la détermination des interactions micellaires à la modélisation globale de l'opération*
A. Bouchoux
 Séminaire interne du laboratoire STLO, 9 oct. 2006, Rennes, FR
- S5 *Modélisation du colmatage lors de la filtration d'un lait : réflexions et approches appropriées*
A. Bouchoux
 Journée du Club Français des Membranes "Théorie et modélisation du transport transmembranaire", 14 juin 2006, Besançon, FR
- S4 *Membranes biologique / synthétique et sélectivité: deux exemples*
A. Bouchoux
 Séminaire interne du laboratoire STLO, 17 fév. 2006, Rennes, FR

- S3 *Integration of nanofiltration in a production process of fermented organic acids - Theoretical considerations and experimental results*
 A. Bouchoux, H. Roux-de Balmann, F. Lutin
 Eurodia technical meeting, 28-30 janv. 2004, Wissous, FR
- S2 *Introduction of nanofiltration in a production process of organic acids*
 A. Bouchoux
 5th Network of Young Membrains, 2-3 oct. 2003, Barcelone, ES
- S1 *Integration of nanofiltration in production processes of fermented organic acids*
 A. Bouchoux
 4th Network of Young Membrains, 5-7 juillet 2002, Toulouse, FR

Produits et documents destinés à des utilisateurs de la recherche et/ou un public plus large
(Liens fonctionnels au 28 février 2017)

- L11 **2013** - Fait marquant & rapport d'activité INRA CEPIA
Structure d'un colloïde naturel : la micelle de caséine du lait
<http://www.cepia.inra.fr/Le-departement-Les-recherches/Nos-resultats/micelles>
<http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237437-0197c-resource-recherches-et-innovations-edition-2013.html>
- L10 **2012** - Plaqueette Soleil / INRA "INRA en lumière : 5 ans de partenariat avec Soleil
Structure de la micelle de caséine : une nouvelle proposition
<http://inra.dam.front.pad.brainsonic.com/ressources/afile/226391-52870-resource-5-ans-de-partenariat-avec-soleil-edition-2012.html>
- L9 **2012** - Site web STLO
Les macromolécules du lait au synchrotron SOLEIL
<http://www4.rennes.inra.fr/stlo/Toutes-les-actualites/Les-macromolecules-du-lait-au-synchrotron-SOLEIL>
- L8 **2011** - Fait marquant & rapport d'activité INRA CEPIA
Structure de la micelle de caséine : de son élaboration à son organisation interne
<http://www.cepia.inra.fr/Le-departement-Les-recherches/Nos-resultats/structure-micelle>
<http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237439-a26da-resource-recherches-et-innovations-edition-2011.html>
- L7 **2010** - Site web STLO
Milk casein micelles investigated as soft matter
<http://www6.rennes.inra.fr/stlo/Main-results/Dairy-Processing/TIPIL-R4>
- L6 **2010** - Lettre "En direct des laboratoires" de l'institut INSIS du CNRS.
Structure et comportement de la micelle de caséine en milieu dense
<http://www.cnrs.fr/insis/recherche/direct-labos/2010/micelle-de-caseine-milieu-dense.htm>
- L5 **2010** - Fait marquant & rapport d'activité INRA CEPIA.
Comportement des micelles de caséine lors de la filtration du lait
<http://www.cepia.inra.fr/Le-departement-Les-recherches/Nos-resultats/caseine-filtration>
<http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237440-2b9a4-resource-recherches-et-innovations-edition-2010.html>
- L4 **2009** - Plaqueette faits marquants du centre INRA de Rennes.
Comportement des micelles de caséine lors des opérations de filtration du lait
<http://www.rennes.inra.fr/content/download/8224/127296> (lien expiré)
- L3 **2009** - Plaqueette INRA CEPIA "Understanding biomolecules assemblies with rheology"
Casein micelles in dense dispersions: interactions and phase behaviour

<http://www.cepia.inra.fr/Outils-et-Ressources/Editions/rheologie/%28key%29/6>
<http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237340-423a6-resource-understanding-biomolecule-assemblies-with-rheology.html>

- L2 **2009** - Rapport annuel INRA
Comportement des micelles de caséine lors des opérations de filtration du lait
<http://inra.dam.front.pad.brainsonic.com/ressources/afile/230748-7e33f-resource-rapport-d-activite-2009.html>
- L1 **2008** - Plaquette INRA CEPIA "Des recherches en génie des procédés"
Comportement des micelles de caséine en milieu concentré
<http://www.cepia.inra.fr/Outils-et-Ressources/Editions/genie-des-procedes/%28key%29/4>
<http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/237332-9064b-resource-des-recherches-en-genie-des-procedes.html>

Annexe C

Copie de 5 publications significatives

- C-1 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2009**
- C-2 Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2010**
- C-3 Ouanezar et al., Langmuir, 2012**
- C-4 Bouchoux et al., Langmuir, 2014**
- C-5 Pasquier et al., Physical Chemistry Chemical Physics, 2016**

Annexe C-1

Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2009

Casein Micelle Dispersions under Osmotic Stress

Antoine Bouchoux,^{†‡*} Pierre-Emerson Cayemite,^{†‡} Julien Jardin,^{†‡} Geneviève Gésan-Guiziou,^{†‡} and Bernard Cabane[§]

[†]INRA, UMR1253, STLO, F-35000 Rennes, France; [‡]Agrocampus Ouest, UMR1253, F-35000 Rennes, France; and [§]PMMH, CNRS UMR 7636, ESPCI, F-75231 Paris cedex 05, France

ABSTRACT Casein micelles dispersions have been concentrated and equilibrated at different osmotic pressures using equilibrium dialysis. This technique measured an equation of state of the dispersions over a wide range of pressures and concentrations and at different ionic strengths. Three regimes were found. i), A dilute regime in which the osmotic pressure is proportional to the casein concentration. In this regime, the casein micelles are well separated and rarely interact, whereas the osmotic pressure is dominated by the contribution from small residual peptides that are dissolved in the aqueous phase. ii), A transition range that starts when the casein micelles begin to interact through their κ -casein brushes and ends when the micelles are forced to get into contact with each other. At the end of this regime, the dispersions behave as coherent solids that do not fully redisperse when osmotic stress is released. iii), A concentrated regime in which compression removes water from within the micelles, and increases the fraction of micelles that are irreversibly linked to each other. In this regime the osmotic pressure profile is a power law of the residual free volume. It is well described by a simple model that considers the micelle to be made of dense regions separated by a continuous phase. The amount of water in the dense regions matches the usual hydration of proteins.

INTRODUCTION

Caseins are a family of proteins that make up to 80% of the protein content of cow milk. In native milk, they are associated into large globular aggregates that are called casein micelles. Their main biological function is the transport and delivery of proteins, calcium and phosphate to the young mammals (1). The composition and structure of the casein micelles have been studied for >40 years, and rather precise descriptions are available, although still controversial (2,3). They are made of four distinct caseins, α_{s1} , α_{s2} , β , and κ in proportion of 3:1:3:1, and 8% in mass of phosphate and calcium ions. The structural model accepted most widely has a roughly spherical, core-shell structure, with outer diameters ranging from 50 to 500 nm (4,5). The core is now generally described as a homogeneous web of caseins in which calcium phosphate nanoclusters are distributed randomly (6,7). The shell is essentially made of κ -caseins that extend into the aqueous phase as a polyelectrolyte brush and in this way produce short range repulsions between micelles (8).

This model has been extremely useful in providing a simplified view of the micelles as semipermanent objects, and in explaining their colloidal stability (9–12). However, it only provides a snapshot picture of an average, idealized micelle. We still need to understand how the structure and the properties of the micelles result from interactions between their components, how they can respond to changes in physical parameters or chemical composition of the system, and what the association-dissociation equilibria between micelles and nonmicellized components are (13).

To explore how interactions determine structure and properties, a general approach consists in changing these interactions and observing the changes in structure. Interesting results have been obtained by changing the physical parameters (temperature, hydrostatic pressure) and measuring the resulting changes in the average structure or in properties such as the sol-gel transition of the micellar dispersion (6,7,14–17). Further information has been obtained by changing the composition of the aqueous phase (pH, ionic strength, addition of molecules that chelate Ca^{2+} ions) or by carrying out chemical reactions within the micelles (chopping off the brush, cross-linking the core) (7,8,10,18–23).

In this study, we chose a more thermodynamic approach that consists in changing the chemical potential of water using the osmotic stress method. In this method, water is removed from the casein micelle dispersion through dialysis against a polymer solution of known osmotic pressure (24–26). After equilibrium is reached, the amount of water that is retained by the casein dispersion is measured. Similar measurements at each osmotic pressure yield the relation of osmotic pressure to casein concentration, which is the equation of state of the system. This equation of state reflects the balance of all interactions (e.g., casein-water, casein-casein, casein-calcium phosphate) in the system. Moreover, examination of the state of the system (liquid, solid, gel) and of its properties (turbidity) at various osmotic pressures yields further information regarding the structures and interactions of micelles at all concentrations, up to conditions where they have been dehydrated substantially. These results are directly applicable to industrial operations in which casein dispersions are dehydrated through filtration, centrifugation, or drying (27,28).

To our knowledge, the osmotic stress method had not been applied to casein micelle dispersions so far. Previous

Submitted May 27, 2008, and accepted for publication October 8, 2008.

*Correspondence: antoine.bouchoux@rennes.inra.fr

Editor: Jane Clarke.

© 2009 by the Biophysical Society
0006-3495/09/01/0693/14 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2008.10.006

experiments on sodium caseinate (SC) by Farrer et al. show that the method is appropriate, i.e., the range of concentrations that can be reached through equilibrium dialysis extends from dilute solutions to very concentrated solutions (29). However, casein micelles dispersions are very different from sodium caseinate solutions, with respect to composition, structure, and interactions (30,31). In this work, we have used aqueous dispersions made from native phosphocaseinate powder (NPC) dissolved in a solvent made from ultrafiltration of skimmed milk (UF permeate). It is known that the casein micelles are quite close to their native state in such a reconstituted milk that is depleted in serum proteins (32,33). The use of UF permeate also ensured that the chemical potential of all ions were identical to their values in milk. UF permeate was also used, after addition of a water soluble polymer, as the stressing solution for osmotic stress experiments. In addition, some experiments were also carried out with a stressing solution that had a higher ionic strength. Finally, we studied the effects of osmotic stress cycles in which the casein dispersions were first deswelled to the solid state, and then reswelled with the original ultrafiltration permeate. The aim of these experiments was to provide some answers to the following questions:

- In dilute dispersions, is it acceptable to describe the dispersion as a collection of identical “micelles”? If not, what is the collection made of?
- In more concentrated dispersions, how do the members of the collection interact? Is there a significant range of concentration where the micelles repel each other through their κ -casein brush? Do they stick to each other when the water that separates them is removed, and if so, what is the casein concentration at this transition?
- At still higher concentrations, what is the cost of removing the water that swells each micelle, and what are the consequences of this deswelling?
- Are the reverse processes at all possible, i.e., is it possible to reswell and then redisperse the micelles after a deswelling stage? If not, what are the cohesive forces that oppose reswelling and redispersion?

MATERIALS AND METHODS

Proteins and dispersions preparation

All experiments were done with dispersions made from casein powders (NPC, SC) dispersed in a solvent made from ultrafiltration of skimmed milk (UF permeate). We made this choice for a number of reasons:

The use of the so-called UF permeate ensures that the chemical potential of all ions is maintained to their values in the native state.

These casein powders lack the milk serum proteins that could interfere in the osmotic pressure measurements.

Even if a truly native state cannot be fully guaranteed, it is generally accepted that NPC powder is an adequate model for milk casein micelles (see Huppertz et al. (16) and Muller-Buschbaum et al. (34) for some recent examples of its use). Famelart et al. have shown that, when UF permeate is used as aqueous phase for reconstitution,

the main properties (micelle size distribution, behavior toward pH gelation) of NPC dispersions are practically identical to those of skimmed milk (32).

Native phosphocaseinate powders were prepared according to a protocol developed by Pierre et al. (33) and Schuck et al. (35). Briefly, skimmed milk was processed through cross-flow microfiltration (0.1 μ m) to separate the casein micelles from the serum proteins. The retentate was washed with 4 volumes of pure water in diafiltration mode. It was then dried in low-temperature conditions through spray-drying. Two batches of powder (NPC powder 1 and 2), prepared from different skimmed milks and at different dates, were used in this study.

Sodium caseinate powder was produced by Armor Protéines (Saint-Brice-en-Coglès, France) according to a protocol similar to that described by Segalen et al. (36). First, the casein micelles from fresh skimmed milk were precipitated through acidification to the isoelectric point of casein at pH 4.6. The acidification also dissociates the calcium phosphate nanoclusters from the micelles (7). Then the precipitated acid casein curd was washed with pure water, re-dissolved in sodium hydroxide solution, and dried through spray-drying.

The composition of the NPC and SC powders are given in Table 1. Caseins and their associated minerals are the main components (total mass >90% of the total solid content). As is usually done for dairy products, the average noncasein and nonprotein nitrogen contents were determined as described in Gaucher et al. (37). The noncasein nitrogen matter is the equivalent protein fraction that does not precipitate at pH 4.6. Pierre et al. (33) showed that this fraction consists mainly of proteose-peptones (i.e., casein fragments of molar mass ~20,000 Da) that associate into small aggregates when in solution. The rest includes serum proteins (β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovine serum albumin (BSA), immunoglobulin G (IgG), phospholipoproteins) and peptides that were not eliminated through the washing step. The nonprotein nitrogen matter is the equivalent peptide fraction that does not precipitate at extreme acidic condition (15% (w/v) trichloroacetic acid solution). It is usually accepted that most of the small peptides (i.e., molecular mass <10,000 Da) present in solution are found in this fraction (37,38).

The UF permeate solvent was prepared through membrane ultrafiltration (5000 Da cutoff) of a fresh skimmed milk. Its average ionic composition is: ~20 mM Na⁺, ~40 mM K⁺, ~10 mM Ca²⁺, ~30 mM Cl⁻, ~10 mM phosphate, ~10 mM citrate (see Jenness and Koops (39) for a full description). It also contains lactose (~150 mM) and a few other low molar mass molecules such as riboflavin, a vitamin that gives it a distinctive yellow color. Thimerosal and sodium azide, both purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), were added to the UF permeate as preservatives at 0.02% and 0.1% (w/w) respectively. The NPC dispersions were prepared by thoroughly mixing the NPC powder in UF permeate for 15 h at 35°C. It has been shown by Gaini et al. (40) that such conditions are sufficient to fully dissociate the protein aggregates that are present in the powder. The SC dispersions were also prepared by mixing for 15 h. In that case, a slightly higher temperature (50°C) was needed for complete dissociation of the SC

TABLE 1 Composition of NPC and SC powders

	TS (%, w/w)	Minerals (% TS)	Caseins (% TS)	Noncasein nitrogen matter (% TS)	Nonprotein nitrogen matter (% TS)
NPC 1	90.4	8.1	85.0	5.7	0.6
NPC 2	91.0	8.5	85.6	4.6	0.6/1.8*
SC	93.4	<3.9	95.7	1.2	0.4/0.6*

All values are given as averages $\pm$ 0.2%. NPC, native phosphocaseinate; SC, sodium caseinate; TS, total solid.

*Values determined for NPC and SC dispersions in UF permeate at ~25 g/L of caseins and after 7 days of incubation at 20°C; for details, see the description of the osmotic stress technique. Details about the peptides present in this fraction are provided in the Supporting Material.

powder. After total dissolution, the pH of the dispersions was 6.7 ± 0.1 at 20°C , i.e., pH of a fresh skimmed milk.

Experiments at modified ionic strengths were done with dispersions prepared from UF permeates in which NaCl (Sigma-Aldrich) was added at 100 mM or 300 mM. It was necessary in these cases to slightly correct the pH of the final dispersions by addition of drops of a 0.1 M NaOH solution to reach 6.7 ± 0.1 at 20°C .

Osmotic stress technique

The osmotic stress technique is based on water exchange between the sample (i.e., a colloidal dispersion) and a reservoir of known osmotic pressure (24,26). The sample is placed in a dialysis bag that, in turn, is immersed in a reservoir that contains a solute for which the relation between osmotic pressure and concentration is known (generally a polymer). The cutoff of the dialysis bag is chosen so that it only retains the polymer and the colloidal matter of the sample. Conversely the solvent, i.e., water, ions, and small organic molecules can exchange between the two compartments. At equilibrium, the chemical potentials of water on either side of the membrane are equal, and therefore the osmotic pressure of the sample equals that of the polymer in the reservoir. This technique makes it possible to play with interactions in a colloidal system over a wide range of pressure, i.e., usually more than 3 decades.

A poly(ethylene glycol) with a molar mass of 35,000 Da (Fluka, Buchs, Switzerland) was used as the stressing polymer. We determined the osmotic pressures of that polymer for concentrations up to 20% (w/w) at 20°C through membrane osmometry (Osmomat 090, Gonotec, Berlin, Germany) and equilibrium dialysis versus T110 Dextran solutions of known osmotic pressure (24). The results were fitted to the following expression for the osmotic pressure Π (Pa) as a function of PEG concentration [PEG] (% w/w):

$$\log \Pi = a + b[\text{PEG}]^c \quad (1)$$

with $a = 0.49$, $b = 2.5$, and $c = 0.29$.

Solutions of PEG at osmotic pressures from ~ 250 Pa to $\sim 500,000$ Pa were prepared by dispersing the polymer in UF permeate, modified or not by addition of NaCl. If necessary, the pH of the resulting solutions was adjusted to 6.7 ± 0.1 at 20°C to match the dialysis bags.

Standard regenerated cellulose Spectra/Por 2 dialysis bags with a molecular mass cutoff of 12,000–14,000 Da were used (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA). These bags were chosen to allow exchange of water, ions, and lactose but not caseins or PEG. Before experiments, the bags were washed in deionized water and conditioned in UF permeate at the appropriate ionic strength. Then casein dispersions, i.e., sodium caseinate or casein micelles in UF permeate at a given ionic strength, were placed in the bags and immersed in the polymer solutions kept at 20°C . In some cases, depending on the osmotic pressure of the reservoir, it was necessary to refill the bags with casein dispersion to obtain a sufficient amount of concentrated dispersion. After equilibrium was reached (from 7 days to 50 days), the casein concentration in each bag was determined through drying at 105°C . For that purpose, the relation between total solid content and casein concentration in g/L was initially determined over a wide range of concentrations with model dispersions.

Despite the relative simplicity of the osmotic stress technique, a fair amount of experimental work was required to adapt it to the peculiarities of casein dispersions. Extreme attention was paid to the integrity of the casein micelle during the process of osmotic compression. Specifically, we observed through Urea-PAGE experiments that a small but significant degradation of caseins molecules occurred in NPC dispersions compressed at low osmotic pressure, i.e., $\Pi < 5000$ Pa after 7 days of dialysis (see the Supporting Material). This degradation was most likely caused by enzymes, including plasmin, that remained in the NPC powder (41). To minimize the effect of this proteolysis, osmotic stress experiments performed at low pressures were limited to 7 days. The casein concentrations in the bags were measured each day. Accordingly, this dialysis time was in most cases sufficient to reach a stable casein concentration. If not,

a new 7 days compression was done starting from a fresh NPC dispersion at a concentration closer to the expected equilibrium casein concentration. In all cases, we found from nonprotein nitrogen measurements (Table 1) that enzymatic proteolysis lead to the presence of a maximum of 2 g of low molar mass peptides for 100 g of caseins after 7 days of dialysis at 20°C . The nature of these peptides was investigated through liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) experiments, which gave a set of molar mass values ranging between 811 Da and 4168 Da. A detailed description of these experiments is provided as Supporting Material.

For osmotic pressures > 5000 Pa, equilibrium was reached between 10 and 50 days of dialysis. Urea-PAGE gels showed that enzymatic degradation was limited to insignificant in these conditions. Indeed, at such pressures, high casein concentrations (> 200 g/L) were quickly reached in the dialysis bags, leading to high viscosity liquids or solids in which enzymes have a much lower activity.

Reswelling experiments

Over a certain range of osmotic pressures, the casein dispersions changed into a solid-like state. To evaluate the cohesion of these solids, simple reswelling experiments were carried out as follows. For each dialysis bag in which such a state was observed at equilibrium, a piece of the resulting solid (~ 0.1 g) was cut out and immersed in a fixed volume of UF permeate (20 mL) at the appropriate ionic strength and without stressing polymer. That solid was then allowed to reswell and/or dissolve during at least 15 h at ambient temperature and under strong agitation. Agitation was then stopped and the dispersion was kept 4 h at rest to allow sedimentation. The casein concentration in the supernatant was then measured by a simple Bradford detection method that was calibrated beforehand with fresh NPC dispersions (42). Knowing the total casein concentration in the dispersion $[\text{Cas}]_t$, the fraction of casein that did not dissolved after reswelling (= the gel fraction), was calculated according to the following expression:

$$\text{Gel fraction (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{[\text{Cas}]_s}{[\text{Cas}]_t} \right) \quad (2)$$

with $[\text{Cas}]_s$ the casein concentration in the supernatant.

RESULTS

General features

The osmotic compression of casein micelle dispersions produces dramatic changes in their rheological, mechanical, and optical properties. These changes are illustrated in Fig. 1 for NPC dispersions in UF permeate. Dispersions equilibrated at low osmotic pressures (~ 450 Pa) are fluids with a moderate turbidity, due to the scattering of light by the casein micelles. At higher osmotic pressures (~ 4500 Pa), the turbidity increases, in line with the concentration of casein micelles, and the dispersions still behave as liquids. Then, for pressures that are in excess of 10,000 Pa, the turbidity starts to decrease, and the content of the dialysis bag becomes a solid with a yellowish color (that was the original color of the UF permeate). This evolution is continued at still higher pressures (45,000 and 450,000 Pa in Fig. 1) where the casein dispersion finally becomes nearly transparent.

Osmotic pressure profiles

Fig. 2 shows the values of osmotic pressures that were applied (through the stressing solution) to reach increasing

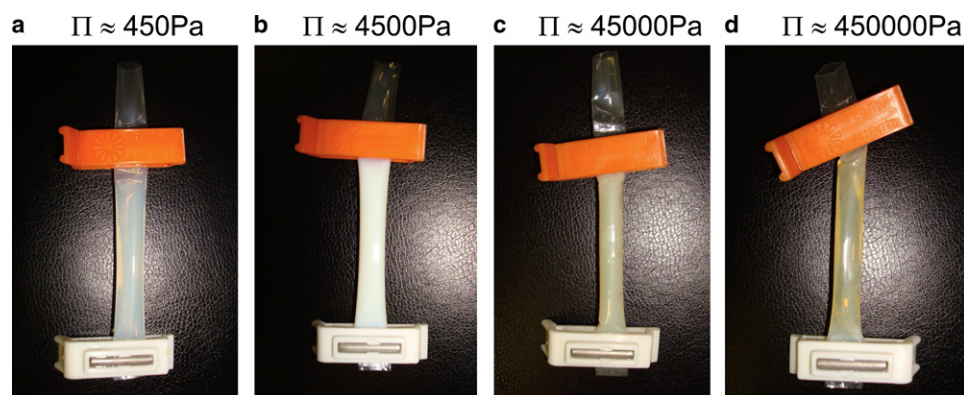


FIGURE 1 Successive states of the casein micelle dispersions equilibrated at increasing values of the osmotic pressure Π .

concentrations of NPC in UF permeate within the dialysis bags. The variations span over 3 decades in osmotic pressures and 2 decades in casein concentrations. Two NPC powders originating from different production batches were used and gave identical results. Hence the osmotic stress method really measures an equation of state or a “material property” of the casein micelle dispersions over an extremely wide range of compositions. At this stage, it is already obvious that this equation of state is made of two very distinct regimes:

A dilute regime in which the osmotic pressure is proportional to the casein concentration. In this regime, all the NPC dispersions are liquids.

A concentrated regime in which the osmotic pressure rises much faster, approximately as the sixth power of concentration. In this regime, the NPC dispersions behave as soft-solids or solids.

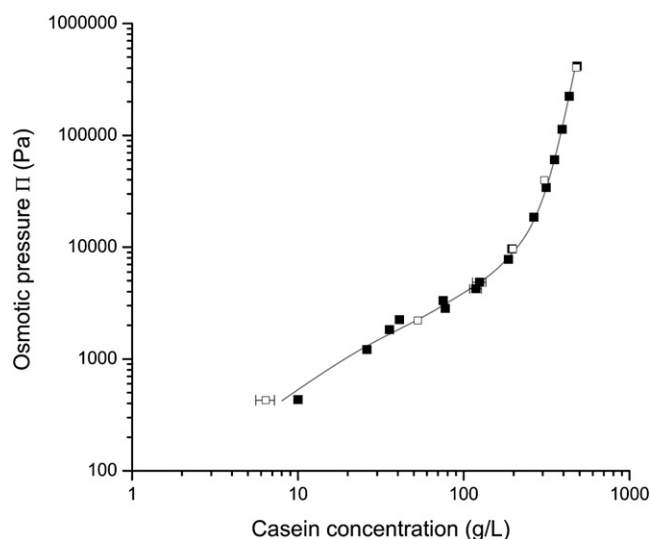


FIGURE 2 Osmotic pressures of casein micelle dispersions: NPC powder 1 in UF permeate (*solid squares*); NPC powder 2 in UF permeate (*open squares*). Vertical scale: osmotic pressure of the stressing solution, in Pa. Horizontal scale, casein concentration within the dialysis bag. The solid line is a guide for the eye.

Similar experiments were carried out with dispersions and stressing solutions made at higher ionic strength through the addition of NaCl (100 mM and 300 mM) to the UF permeate that originally contains 20 mM of Na^+ and 10 mM of Ca^{2+} for an estimated 80 mM ionic strength. Remarkably, the effects of ionic strength are in opposite directions for the two concentration regimes defined above (Fig. 3 a). In dilute dispersions, the addition of NaCl depresses the osmotic pressure (or makes it easier to concentrate the dispersions). In concentrated dispersions, the addition of NaCl increases the magnitude of the osmotic resistance, but the power law of osmotic pressure versus concentration seems to remain the same. In this regime, dispersions of NPC in UF permeate with 300 mM of added salt had a compression resistance that was nearly twice as high as that of dispersions in UF permeate (Fig. 3 b).

The osmotic pressures of casein dispersions in UF permeate were also compared with those of sodium caseinate in the same solvent (Fig. 4). The results are markedly different. Indeed, the osmotic pressures of sodium caseinate rise as a single power law of concentration over most of the concentration range, and the exponent is slightly above 2.5. Because both sets of experiments were carried out with the same aqueous solutions (UF permeate), the differences must reflect the different compositions and structures of NPC dispersions versus SC dispersions.

Phase behavior

As already mentioned, the NPC dispersions changed from a fluid state to a soft solid state over a range of osmotic pressures and concentrations that we call the transition region. A similar liquid-solid transition was observed for all the systems investigated (NPC powder in UF permeates at different ionic strength and SC powder in UF permeate). To better understand this behavior, the location of the transition range was estimated by direct observations. The reversibility of the phase transition was also assessed through additional experiments for all the dispersions investigated.

Fig. 5 presents the boundaries of the transition region: the lower boundary is taken as the last sample that flows as

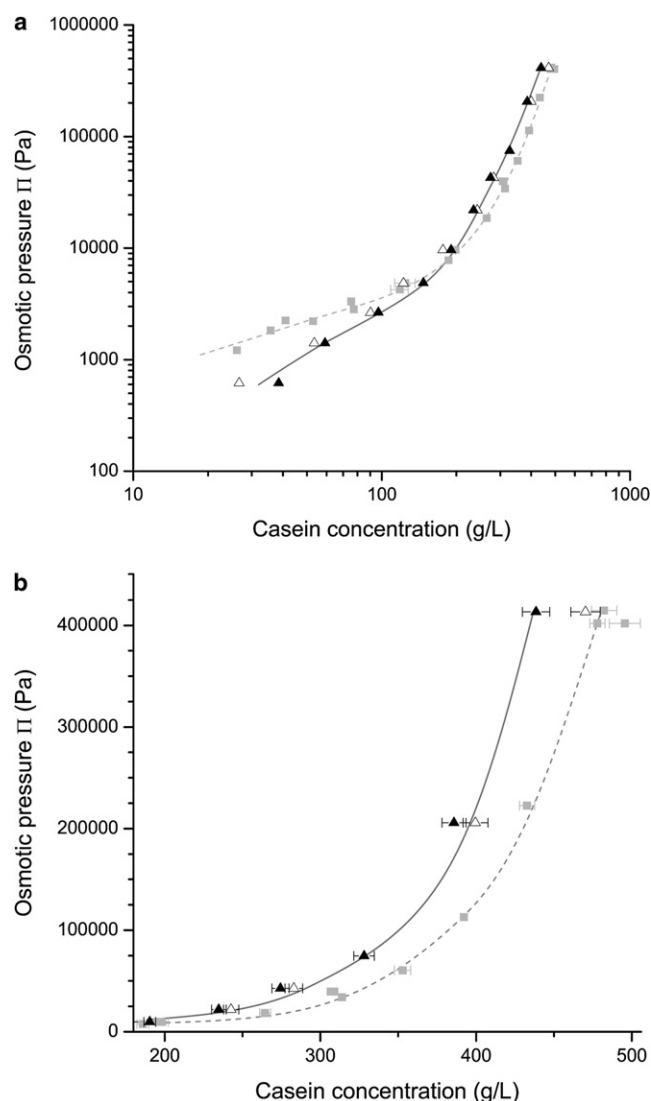


FIGURE 3 Effect of ionic strength on the osmotic pressures of casein micelle dispersions: NPC powders 1 and 2 in UF permeate (*shaded squares*); NPC powder 2 in UF permeate + 100 mM NaCl (*open triangles*); NPC powder 2 in UF permeate + 300 mM NaCl (*solid triangles*). The dashed and solid lines are guides for the eye. (a) Plot over the whole range of casein concentration, log scale. (b) Plot for high casein concentrations, linear scale.

a homogeneous fluid, and the upper boundary as the first sample that does not flow at all under the effect of gravity (i.e., it has a yield stress). Because there is a unique relation between concentration and osmotic pressure, the boundaries can be traced in either representation (Fig. 5, *a* and *b*). For the dispersions of NPC in UF permeate (no added NaCl), the upper boundary was located at a casein concentration of 200 g/L (Fig. 5 *a*). This is close to the concentration of casein within a micelle (~230 g/L) that can be deduced from the so-called voluminosity of the casein micelle (estimated by different authors at ~4.4 mL/g of casein (4,43–48)). Hence, at the upper boundary, the volume fraction that is occupied by the micelles is 0.88 (Fig. 5 *a*), which is

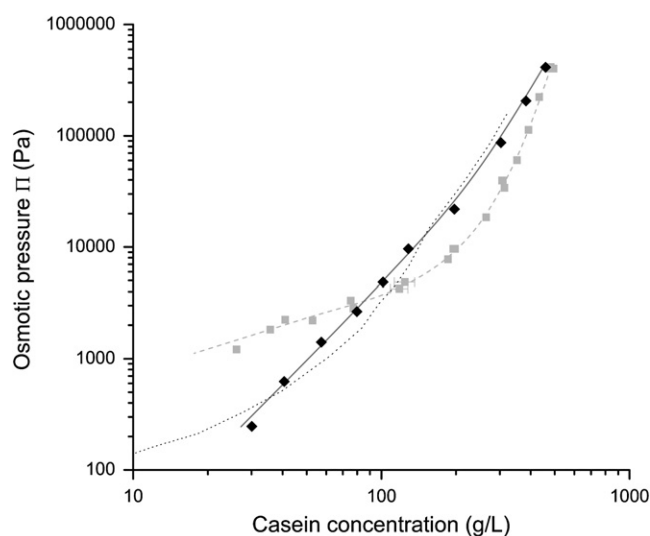


FIGURE 4 Comparison of casein micelles dispersions with sodium caseinate solutions: NPC powders 1 and 2 in UF permeate (*shaded squares*); SC powder in UF permeate (*solid diamonds*). Dotted line: data for sodium caseinate in water + 100 mM NaCl as measured by Farrer et al. (29). The dashed and solid lines are guides for the eye.

in between the volume fraction for a dense packing of monodisperse spheres (0.74) and that for space-filling packing of polydisperse spheres (1.00). The addition of monovalent salt (NaCl) shifts the transition to lower casein concentrations (150 g/L, i.e., 0.66 volume fraction, with 300 mM of added NaCl) and lower osmotic pressures. For comparison, the fluid-solid transition of sodium caseinate in UF permeate is also indicated: it takes place at higher concentrations and much higher pressures than that of the casein dispersion. Additional information is given by the visual appearance of the dispersions. In the transition region, all NPC dispersions were highly turbid and the upper boundary was near the maximum of turbidity before the dispersions start to progressively acquire a yellowish color (that is the UF permeate color). On the other hand, the optical properties of the SC dispersions were unchanged (translucent and yellow) over the whole range of osmotic pressure, including the transition region.

Beyond the liquid-solid transition, i.e., in the concentrated regime, the dispersions were still compressible, even though the casein micelles were densely packed. These extreme compressions produced changes that were not fully reversible. The reversibility of the compression was tested through reswelling experiments. After reswelling, the sample consisted of a gel (mechanically coherent) and a sol (fluid). The remaining gel fraction, as defined in Eq. 2, was then determined. This relatively straightforward test gave remarkable results that are presented in Fig. 6. For all NPC dispersions equilibrated at pressures above the transition, the compression was not fully reversible, and the gel fraction grew with the magnitude of the applied pressure. The extent of irreversibility turned out to be quite sensitive to the nature

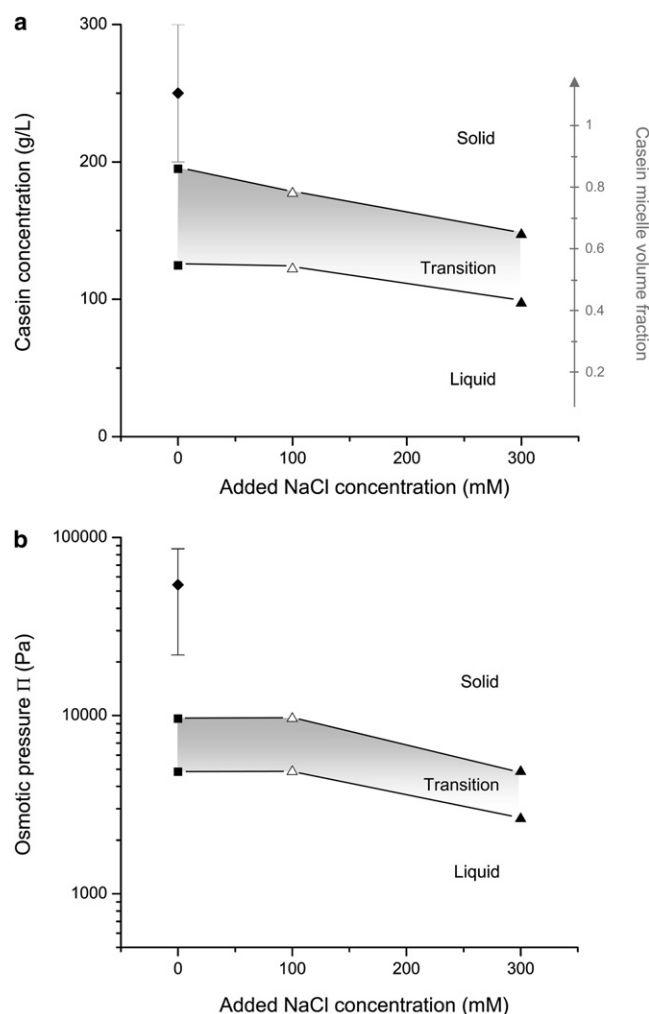


FIGURE 5 Liquid-solid transition for NPC and SC dispersions in UF permeate, as a function of the concentration of added NaCl. (a) Casein concentration at the transition. (b) Osmotic pressure at the transition. NPC powder 1 in UF permeate (squares, triangles); SC powder in UF permeate (diamond). The volume fraction occupied by the casein micelles was estimated using a micelle voluminosity of 4.4 mL/g (4). It is indicated in (a) (right vertical axis).

of the dispersion. The addition of NaCl (100 mM and 300 mM) to the UF solvent caused the gel fraction obtained at $\sim 10,000$ Pa to rise from 20% to 60% of the total mass of casein. This was clearly a direct effect of NaCl on NPC (all other ion concentrations remained the same in all the UF permeates used). On the other hand, the compression of sodium caseinate dispersions was always fully reversible, regardless of the equilibration pressure (Fig. 6).

Summary of results

The results presented above can be summarized as follows. The osmotic stress method really measures an equation of state of the casein micelle dispersions over an extremely wide range of pressures and concentrations. This equation of state is made of three different stages: i), a dilute regime

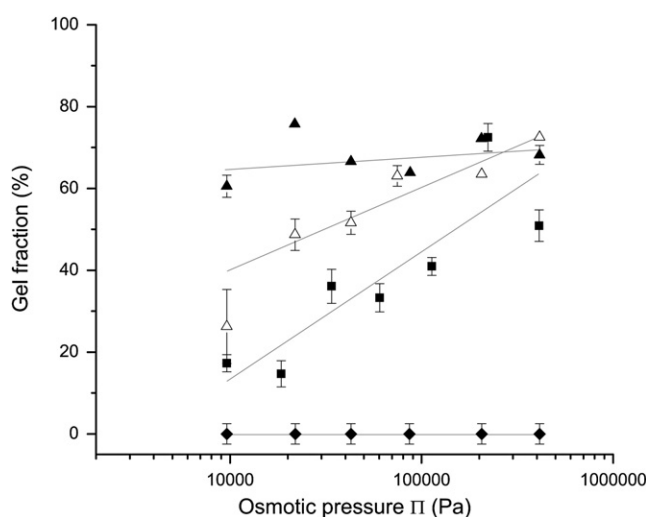


FIGURE 6 Remaining gel fraction in casein dispersions after compression at pressures ranging from $\sim 10,000$ to $\sim 450,000$ Pa and reswelling in the appropriate solvent: NPC powder 1 in UF permeate (squares); NPC powder 2 in UF permeate with addition of 100 mM NaCl (open triangles); NPC powder 2 in UF permeate with 300 mM NaCl (solid triangles); sodium caseinate in UF permeate (diamonds). The lines are guides for the eye.

in which the casein micelles dispersions are liquid and the osmotic pressure is proportional to the casein concentration; ii), a transition range that is complete when the micelles are densely packed, and the dispersion behaves as a coherent solid; and iii), a concentrated regime in which the osmotic pressure rises approximately as the sixth power of concentration. In this last regime, compression removes water from within the micelles, and increases the fraction of micelles that are irreversibly linked to each other within the gel network.

DISCUSSION

The aim of this discussion is to rationalize the osmotic stress behavior of casein dispersions in terms of interactions between or within the different components of these dispersions. This will be done for each of the three compressive stages that have been defined previously.

Dilute regime

The dilute regime comprises the NPC dispersions equilibrated at pressures up to 5000 Pa (Figs. 2 and 3). These dispersions are turbid fluids, with casein concentrations from 10 to 125 g/L. In this regime, the osmotic pressures are approximately proportional to the casein concentration. This is the typical behavior of dispersions in which repulsive interactions are insignificant. It makes sense, because the volume fraction that is occupied by the micelles at such concentrations remains below $\phi = 0.55$ (Fig. 5 a). Therefore volume exclusion effects are not yet important in this regime. The same must be true of ionic interactions between

neighboring micelles because they are short range interactions in UF permeate.

If repulsive interactions are insignificant, then the osmotic pressure is a true colligative property, which measures numbers only. It must be the sum of contributions from all the noninteracting species in the dispersion, according to van 't Hoff's law

$$\Pi = RT \sum_j c_j \quad (3)$$

with noninteracting species i, j , etc. at concentrations c_i, c_j , etc. expressed in moles per unit volume; T is the temperature and R is the ideal gas constant.

Fig. 7 shows the osmotic pressures calculated from Eq. 3 assuming that the casein micelles are the only species in the dispersions (line 1 at the bottom of Fig. 7). The number concentration c_m of casein micelles was estimated from an average molar mass of 2.8×10^8 Da (44). The pressures predicted by the van 't Hoff equation are >3 orders magnitude lower than the experimental ones. Hence the species i, j , etc. that contribute to the osmotic pressure in the dilute regime are not (only) the casein micelles, but also residual species with a much lower molar mass. Because their concentration is low, these species still do not interact with each other, yet they are sufficiently numerous to contribute to the osmotic pressure. This is a classical result: for instance, in latex dispersions, Bonnet-Gonnet et al. (24) have found that the osmotic pressures in the dilute regime (also on the order of 1000 Pa) originate from small macromolecules (average molar mass 3000 g/mol) that coexist with the latex particles.

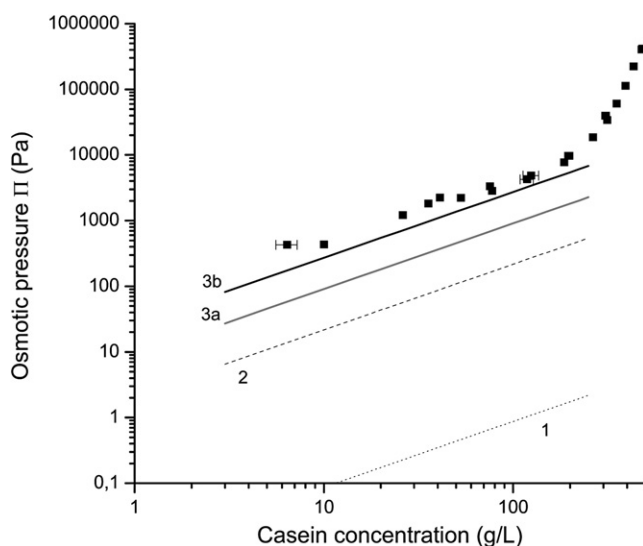


FIGURE 7 Comparison between the osmotic pressures of NPC dispersions (solid squares) and the predictions of van 't Hoff's law in the dilute regime. The osmotic pressures were calculated through Eq. 3, using the estimated number concentrations of: casein micelles (1, dotted line); serum proteins, serum caseins and proteose-peptones (2, dashed line); low molar mass residual peptides (fresh NPC dispersion: 3a, shaded line; after 7 days of dialysis at 20°C: 3b, solid line).

In the NPC dispersions, different types of macromolecules coexist with the casein micelles:

Minimicelles: as proposed by Muller-Buschbaum et al. (49), casein "minimicelles" (~20 nm in diameter) could be in coexistence with ordinary observed casein micelles ranging from 50 to 500 nm in diameter. It is however difficult to assess their number concentration in the NPC dispersions used in this study. On the other hand, a simple calculation shows that the increase in osmotic pressure they could cause is insignificant even if their number concentration is overestimated.

Residual serum proteins (β -lactoglobulin, α -lactalbumin, BSA, IgG, lactoferrin): these were identified and quantified by reverse phase high-performance liquid chromatography measurements following a method described in Resmini et al. (50) (results not shown). This gave an overall concentration of 0.6% of total solid in the NPC powders.

Serum caseins: these are caseins (mainly β and α_{s1}) that are not bound into the micelles. Instead, they form much smaller aggregates from 10 to 25 unimers in conditions similar to those of this study (51–55). The maximum concentration of these serum caseins is generally estimated to be 10% of the total casein concentration (56,57).

Proteose-peptones: these are casein fragments of molar mass ~20,000 Da that also associate into small aggregates when in solution (33). The concentration of these fragments is ~5% of the total casein concentration (noncasein nitrogen in Table 1).

Peptides: these are smaller protein fragments that have molar masses ranging from 800 to 10,000 Da (the molar masses of the main peptides have been determined through HPLC and MS and are presented in Supporting Material). HPLC results showed that they do not cross the dialysis bags during the 7 days of compression, presumably because the pores are packed with caseins that let through water and small ions but not these peptides (Supporting Material). Peptides are initially present in the NPC powder (0.6% of total solid, non-protein nitrogen in Table 1) but their concentration increases with dialysis time since proteolysis occurs. For diluted NPC dispersions, after 7 days of dialysis at 20°C, their mass concentration reaches a maximum of 2% of the total casein concentration (Table 1).

Fig. 7 presents the contributions of these different species to the osmotic pressure of the NPC dispersion in UF permeate, calculated according to van 't Hoff's law and with reasonable approximations regarding molar masses and concentrations. The contributions of non micellar caseins, proteose-peptones and serum proteins are small compared to experimental pressures. On the other hand, the contribution of peptides is comparable to the experimental pressures, due to their low

molar mass. We may conclude that, in the regime of large dilutions, where the dispersed species do not interact, the osmotic pressure of the dispersion is dominated by the contribution from small peptides. An additional piece of evidence that supports this conclusion is the comparison of NPC dispersions with sodium caseinate solutions (Fig. 4). Indeed, the osmotic pressures from sodium caseinate are much lower, and they rise much more steeply than those of NPC. This is consistent with the fact that sodium caseinate is produced through a precipitation process that minimizes the amount of impurities and residual enzymes compared to the NPC powder (Table 1).

This analysis assumes that the number of free macromolecules remains proportional to the total casein concentration. The observation that the osmotic pressure of casein dispersions in UF remains proportional to the casein concentration indicates that this must be the case. However, in different solvents, the relative numbers of free macromolecules may not be the same. Indeed, osmotic stress experiments performed at higher ionic strengths gave lower osmotic pressures (Fig. 3 a). This effect could be explained by a shift in the association equilibria of the different species in the dispersion: if the small peptides are amphiphilic, then the addition of NaCl may promote the formation of casein-peptides complexes and thus depress the number of free macromolecules that contribute to the total osmotic pressure. The addition of NaCl may also shift other association equilibria, such as the micelle-free caseins equilibrium, but this is expected to have a smaller effect on the osmotic pressures.

Transition range

In this transitional regime, and for all the NPC dispersions, the osmotic pressure is no longer proportional to casein concentration but starts to rise very much faster (Figs. 2 and 3). Simultaneously, the dispersions change from a liquid state to a soft-solid state that is not fully redispersible in its solvent. This section aims at understanding these phenomena and explaining the relationships that exist between them.

On the one hand, the abrupt increase in osmotic resistance cannot be explained by the contribution from the small peptides. Indeed, at casein concentrations that are just before the transition (100–125 g/L), their volume fraction is still quite low (~ 0.002) and their interactions are still weak. As a result, their contribution to the osmotic pressure must remain proportional to the total casein concentration. On the other hand, at the onset of the transitional regime, the volume fraction occupied by the casein micelles is $\phi = 0.55$ and the first solid sample was at $\phi = 0.88$ (Fig. 5 a). This is exactly the range of volume fractions where a polydisperse liquid of hard spheres has a transition to a glassy phase: the transition is at $\phi = 0.63$ for a monodisperse distribution of sizes, and closer to $\phi = 1$ for the extreme case of a polydisperse system with an Appolonian distribution of diame-

ters (58,59). Hence, the transitional regime marks the onset of strong interactions between the casein micelles.

This correspondence between the fluid-solid transition of casein micelles and that of the polydisperse hard sphere liquid indicates that the casein micelles do interact with short range repulsions only. Indeed, long-range repulsions would have produced a fluid-solid transition at a lower volume fraction, as in colloidal crystals that are made in deionized water (60). Accordingly, the repulsions produced by the κ -casein brush at the micellar surfaces must be very short range. This is in agreement with a brush thickness usually estimated at 7 nm (8,10).

If the κ -casein brush is compressed, then the micelles may have been forced to come into direct contact. The results of the reswelling experiments might be an indication of that forced contact. Indeed, the samples obtained at the end of the transition were cohesive gels, i.e., they did not redisperse entirely upon transfer from the high osmotic stress conditions to a low osmotic stress environment (Fig. 6). At first, such a gel transition may appear as a surprise, because the κ -casein brush is expected to provide colloidal stability and thus prevent any irreversible sticking of the micellar surfaces. However, previous osmotic stress experiments on latex particles have shown that equilibrium at high osmotic stress makes it possible for particles to bridge through hydrophobic interactions even when they are covered by a polyelectrolyte brush (24). Additionally, it has been suggested that κ -caseins do not homogeneously cover the micelle surface but rather forms small islands surrounded by other, more hydrophobic, caseins (11). This feature may further facilitate irreversible sticking on contact between the micelles.

The experiments carried out at different ionic strengths provide additional information regarding the nature of intermicellar interactions. First, when increasing ionic strength, there is a slight shift of the fluid-solid transition to lower pressures and volume fractions (Fig. 5). As the micelle sizes do not change significantly with ionic strength (21,61), this must be an effect of a shift in the balance of attractions and repulsions. Indeed, particles that attract rather than repel may undergo a fluid-solid transition at lower volume fractions (60,62). Second, there is a major change in the cohesion of the solid, as the gel fraction changes from 15% to 60% (Fig. 6). Again, this must reflect a shift in the balance of attractions and repulsions. Indeed, hydrophobic groups that may be protected by the κ -casein brush at low ionic strength may become more accessible when this brush is partially collapsed at high ionic strength (10). Recently, such an effect of salt addition on the balance of attractions and repulsions between micelles was also reported on casein micelles thin films, i.e., in a concentration regime that resembles the transitional regime discussed here (49).

The behavior of sodium caseinate must be interpreted differently, because there was a liquid-solid transition (at casein concentrations between 175 and 260 g/L) but no gel transition (indeed all samples redispersed entirely when

they were transferred from high osmotic stress to a low osmotic stress conditions). It is known that, at such concentrations, the macromolecules of sodium caseinate are interpenetrated (29,30). Hence the fluid-solid transition may result from entanglements of the caseinate macromolecules. However, because no gel transition took place, we must conclude that the attractive interactions that bridge casein micelles together are absent in sodium caseinate. These observations match those from Farrer and Lips (29): “We found that even quite concentrated caseinate solutions (330 g/L) show the viscoelastic behavior of entangled polymer systems rather than of gel networks.”

In summary, the application of moderate osmotic stress, in the range of 5000–10,000 Pa, is sufficient to produce two transitions in casein dispersions: i), a liquid-solid transition, caused by repulsions between κ -casein brushes, that can be compared to the fluid-solid transition of the polydisperse hard sphere liquid; and ii), a gel transition, caused by attractive interactions, that is reminiscent of the sol-gel transitions that take place when the κ -casein brush is degraded through enzymatic treatment (i.e., the well-known renneting process in cheese-making (8)).

Concentrated regime

This regime starts at a casein concentration of ~ 200 g/L (Fig. 5 a). As already mentioned, the volume fraction that is occupied by the micelles is then $\phi = 0.88$: most of the water that separates the casein micelles has been extracted and irreversible connections start to be formed between them. Further compression led to casein concentrations up to 500 g/L. Such concentrations are well above the casein concentration within a micelle (230 g/L taking a voluminosity of 4.4 mL/g). This shows that all the water that separates the micelles has been extracted and that compression now causes the micelles to deform and deswell.

Another indication of this transformation to a gel phase is the observation that the gel fraction, which cannot be re-dispersed by dilution, increases continuously through the concentrated regime (Fig. 6). At high ionic strengths (+100 mM and +300 mM NaCl), these intermicellar connections are established more easily so that the solid cohesion is less sensitive to osmotic pressure.

As a result, the dispersion can now be considered as a continuum (at the scale of the micelle) and the osmotic pressure can be understood as the compression resistance of the casein micelle itself, i.e., the casein micelle interior. At the start of the concentrated regime, the dispersions are still white/turbid, indicating that the distribution of water and proteins within the micelles is still heterogeneous, e.g. dense regions (lumps) separated by a continuous phase. Further compression into this regime causes the turbidity to subside, and the compressed dispersions become totally translucent at 450,000 Pa (Fig. 1). This loss of turbidity indicates that the water that separates the dense regions has been removed.

Models

A simple model for the structural evolution of the micelles through this regime assumes that all the protein and calcium phosphate are in the lumps, and that the continuous phase contains water and small ions only. In this case the resistance to extraction of water must originate from the thermal agitation of the lumps and from their interactions. The simplest version of this model is the hard sphere liquid, in which the micelle interior is described as a collection of nonconnected hard spheres that occupy a fraction ϕ of the total volume. In this case, the osmotic pressure originates from the thermal agitation of the spheres. The rise of the osmotic pressure with increasing ϕ is related to the loss of available configurations. This is given by the Carnahan-Starling equation (63),

$$\frac{\Pi}{nkT} = \frac{1 + \phi + \phi^2 - \phi^3}{(1 - \phi)^3}, \quad (4)$$

with n the number density of spheres.

Fig. 8 shows that Eq. 4 fits remarkably well the experimental data with spheres of diameter $d_p = 8.8$ nm and mass $m = 1.56 \times 10^5$ Da. With these parameters and knowing the voluminosity of the casein micelle (~ 4.4 mL/g of casein), the average distance between these spheres can be estimated if we consider that they are placed on a regular (e.g., face-centered cubic) lattice. Such a calculation leads to a distance d between 12 and 17 nm. Interestingly, this distance is quite close to the correlation length λ that has been measured through neutron or x-ray

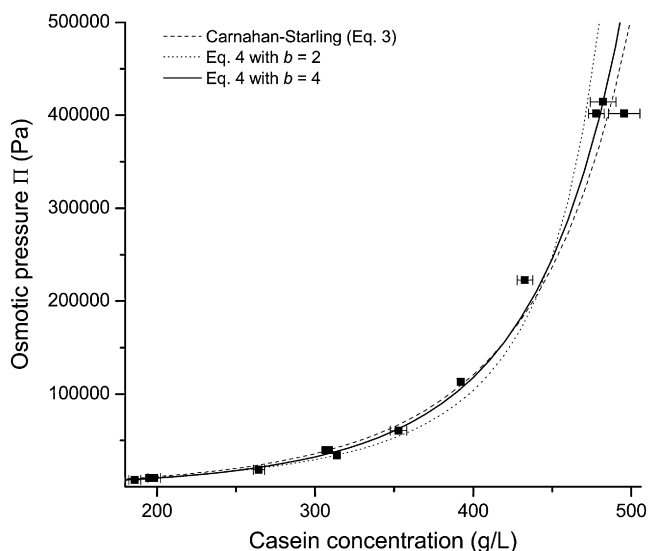


FIGURE 8 Osmotic pressures of NPC dispersions in the concentrated regime: NPC powders 1 and 2 in UF permeate (solid squares). The dashed line is calculated through the Carnahan-Starling equation (Eq. 4) for hard sphere particles of diameter 8.8 nm and mass 1.56×10^5 Da in casein. The dotted and solid lines are calculated through Eq. 5 with $b = 2$ and 4 respectively.

scattering ($\lambda = 16\text{--}18$ nm (49,64–66)) for casein micelles and is interpreted commonly as the distance between the calcium phosphate nanoclusters that are present in their internal structure. Moreover, an average casein micelle of 2.8×10^8 Da (44) would contain ~ 1800 of these spheres, which is of the same order as the number of nanoclusters in a micelle (~ 800 (65)). This correspondence suggests that one could identify the calcium nanoclusters and their direct environment to equivalent objects that interact as hard spheres.

However, it is clear that this model cannot be taken as a realistic model for the internal structure of the casein micelles. Indeed, it assumes that the spheres have no interactions besides excluded volume effects. This would yield very distinct correlations at a distance equal to the sphere diameter (67). These correlations would show up as an enormous peak at a scattering vector $q = 0.6\text{ nm}^{-1}$ in the small angle x-ray scattering (SAXS) and small angle neutron scattering (SANS) spectra. In fact, the experimental SAXS or SANS spectra only show weak oscillations in the corresponding range of q , even at the highest casein concentrations, indicating that the correlations are considerably more complex than those of hard spheres (7,65,66,68).

A more realistic model would be to consider the micelle as made of connected particles (caseins and calcium phosphate nanoclusters) in a continuous phase. Based on recent experimental studies (transmission electron microscopy, SAXS, and SANS), such a network approach is now accepted widely (7,65,68,69). However, several network models exist and differ in the detailed description of the units that are linked by these bonds, and of the resulting correlations. At one extreme, there are uniform protein matrix models in which the only characteristic length is the distance between calcium phosphate nanoclusters (1,6,7). At the other extreme, there are true network models in which the casein molecules are assembled to form branched aggregates, which are cross-linked by the calcium phosphate nanoclusters (69). For the interpretation of osmotic stress experiments, we have no rationale for choosing one model rather than another.

A more model independent approach is based on the free volume concepts that have been used to describe the behavior of polymer solutions (71,72) and also of systems that are jammed by increasingly dense packing (73). In such a model, the system has a limiting concentration C^* that would be reached through compression at extremely high pressures. At lower pressures, the actual casein concentration is C , and the divergence of the osmotic pressure upon approaching C^* would follow a law of the type

$$\frac{\Pi}{aC} = \left(1 - \frac{C}{C^*}\right)^{-b} \quad (5)$$

in which a and b are adjustable parameters. A very acceptable fit is obtained for $b = 4$ (Figs. 8 and 9). In such a case,

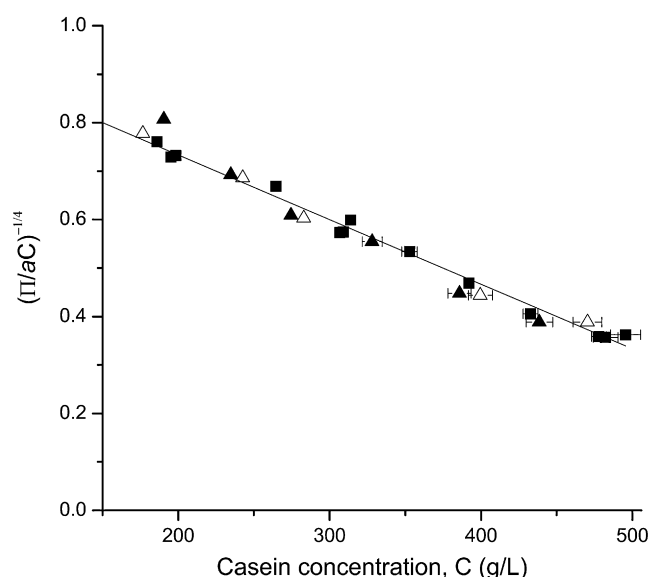


FIGURE 9 Unified model (Eq. 5) for the osmotic pressure of NPC dispersions in UF permeate at different ionic strengths: NPC powders 1 and 2 in UF permeate (solid squares); NPC powder 2 in UF permeate + 100 mM NaCl (open triangles); NPC powder 2 in UF permeate + 300 mM NaCl (solid triangles). The parameter a was taken as 14.0, 20.0 and 21.5 for NPC in UF permeate + 0, + 100 and + 300 mM NaCl respectively. The full line is $(1 - C/C^*)$ with $C^* = 750$ g/L.

$a = 14.0$ and the osmotic pressure diverges for $C^* = 750$ g/L. In the case of a network that contains dense lumps, this value is the concentration of the high density regions in the casein micelle; the work of compression that is carried out in the concentrated regime is used to extract the aqueous phase from the pores that separate these dense regions. It is also interesting to figure out how much water remains in the dense regions at the end of the compression in the dense regime. For that calculation, a weighted average partial specific volume of 0.733 mL/g is taken for the caseins (44). The mass fraction of calcium phosphate is ~ 0.08 and it is mainly present as nanoclusters with a density close to 2.1 g/mL (74). This leads to ~ 0.5 g of water per gram of dry casein. Interestingly, this value is quite close to the full hydration of a typical globular protein in water ($0.3\text{--}0.4$ g/g (75,76)). This suggests that this residual water is the water that is intimately linked to the caseins. It will only be extracted in another compression regime, at extreme pressures, that lead to total dehydration of the casein molecules.

Ionic strength effect

The experiments carried out with NPC dispersions at higher ionic strength required higher osmotic pressures, indicating that the casein micelle was harder to compress when NaCl was added (Fig. 3). This effect of salt addition is fully consistent with the experimental results of Famelart et al. who found an increase in the water content of $75,000 \times g$

ultracentrifugation pellets of NPC dispersions at increasing NaCl concentrations (77). It could be explained through a loss of calcium from the micelle upon addition of NaCl (21,77). According to Huppertz et al. (21), this release of Ca^{2+} is not associated with a loss of phosphorus, indicating that it originates from Ca^{2+} bound to caseins molecules and not from the calcium phosphate nanoclusters. Accordingly, this $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ exchange may dissociate some of the calcium bridges that hold the casein molecules together and also increase the ionic pressure inside the micelle. These effects would lead to a network that is less connected, contains more monovalent ions, and therefore would further resist compression.

In the view of a network that contains dense regions (lumps) separated by pores, the analysis of the data according to Eq. 5 shows that the model is able to describe the results obtained at all ionic strengths with $b = 4$, $C^* = 750 \text{ g/L}$, and a ranging from 14.0 to 21.5 (Fig. 9). The possibility of using a single value for C^* over the range of ionic strengths suggests that the hydration of the dense regions is not modified; only the pores between these regions are harder to compress when Ca^{2+} ions are replaced by Na^+ .

Sodium caseinate

A completely different behavior was obtained with sodium caseinate in UF permeate. Over the whole concentrated regime, the osmotic pressures of sodium caseinate are higher than those of the NPC dispersions, but their rise is not nearly as steep (Fig. 4). These differences make sense because sodium caseinate dispersions no longer contain any calcium phosphate. In terms of interactions, some important attractive forces that contribute to the structure and cohesion of casein micelles are therefore absent from the sodium caseinate dispersions. The lack of any such attractive forces in sodium caseinate dispersions is shown by the observation that their compression is fully reversible (Fig. 6). Accordingly, and as already suggested by Farrer and Lips (29), it may be more appropriate to describe a sodium caseinate dispersion as a polyelectrolyte solution. The polyacrylic acid (PAA) solutions studied by Bonnet-Gonnet et al. (24) are a good example of such a system. Fig. 10 shows the comparison between the osmotic pressures of PAA in water with 100 mM NaCl at two pH values and those of sodium caseinate in UF permeate. For PAA systems, identical pressures were obtained at both pH values, indicating that ionic interactions were largely screened in both cases. Both osmotic pressure profiles have the same exponent (~ 2.7), which confirms that the osmotic resistance of sodium caseinate dispersions has the same origin as that of a usual polymer solution, i.e., the entropy of mixing of the polymer segments with the solvent. However, the profiles differ by a constant concentration factor that takes into account the mass per segment of each polymer. This concentration factor is ~ 5.5 , suggesting that the statistical segment of sodium

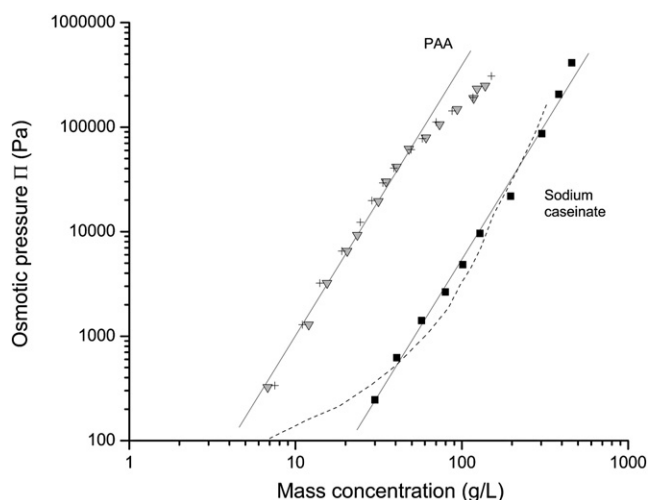


FIGURE 10 Comparison between the osmotic pressures of sodium caseinate and pure polyacrylic acid (PAA): SC powder in UF permeate (solid squares); Sodium caseinate in water + 100 mM NaCl as measured by Farrer et al. (29) (dashed line); PAA at pH 9 in water + 100 mM NaCl (crosses); PAA at pH 3 in water + 100 mM NaCl (inverted triangles). See Bonnet-Gonnet et al. (24) for details in the experiments carried out with PAA. The lines are guides for the eye but have identical slopes (exponent 2.7).

caseinate is much larger than that of a usual polymer such as PAA.

CONCLUSIONS

The osmotic stress technique was successfully applied to dispersions of native casein micelles, i.e., dispersions made from NPC powder in skimmed milk UF permeate. This method measured an equation of state of the dispersions over an extremely wide range of pressures and concentrations. We found that this equation of state has three distinct regimes in which very different phenomena take place: i), a dilute regime in which the micelles (and the other dispersed species) are far from each other and do not interact; ii), a transition range that is complete when the casein micelles are densely packed; and iii), a concentrated regime in which compression removes water from within the micelles.

A detailed analysis of the results obtained in these three different compressive regimes and at different ionic strengths ($+0$, $+100 \text{ mM NaCl}$, $+300 \text{ mM NaCl}$) has been conducted. These results were also compared to the osmotic pressures of sodium caseinate in UF permeate. Accordingly, the questions raised in the introduction section of this study can be reasonably answered as follows:

- In the dilute regime, the cost of removing water from the NPC dispersions is mainly the cost of the osmotic compression of a solution containing the residual small peptides that are present in such dispersions. In a proper description of casein micelles dispersions made from NPC

powders, one consequently needs to take into account these small species.

- b. The application of moderate osmotic stress, in the range of 5000–10,000 Pa, is sufficient to produce two successive transitions in casein dispersions: a liquid-solid transition, caused by repulsions between κ -casein brushes, that is similar to the fluid-solid transition of the hard sphere liquid; and a gel transition, caused by attractive interactions, when the micelles are in contact at ~ 200 g/L. That second transition is reminiscent of the sol-gel transition that takes place when the κ -casein brush is degraded through enzymatic treatment such as the well-known renneting process in cheese-making.
- c. At higher concentration, the micelles are in contact and there is no longer any intermicellar continuous phase. The osmotic compression causes the casein micelles to deform and deswell and the turbidity of the dispersions decreases. In a simple model, the micelle core is made of dense regions (lumps) of concentration C^* that are distributed in an intramicellar continuous phase from which water is extracted on compression. The pressure diverges at C^* when all the water between the lumps is extracted. This concentration corresponds to a hydration of the lumps that is close to the typical hydration of globular proteins.
- d. When the micelles have been brought into direct contact and then compressed further, some of them can no longer be separated through reswelling. Hence some cohesive forces have been turned on by the compression. However, the compression of sodium caseinate, where the calcium phosphate nanoclusters have been removed, is fully reversible. This suggests that these cohesive interactions result from ionic and hydrophobic forces that take place at the surface of the casein micelles. These structure-dependent forces are disrupted when the micelles are dissociated through dissolution of the calcium phosphate nanoclusters.

SUPPORTING MATERIAL

Materials, results, three figures, one table, and three references are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(08\)00056-8](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(08)00056-8).

We thank M. N. Madec from UMR1253 for assistance with some of the experimental work. V. Gagnaire and I. Gaucher from UMR1253 are thanked for their help in doing the Urea-PAGE experiments and preparing the samples for LC-MS analysis. We are also grateful to J. Fauquant, F. Garnier, and P. Schuck from UMR1253 for preparing and providing us with the NPC powders and the UF permeate.

REFERENCES

1. Holt, C. 1992. Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.* 43:63–151.
2. Horne, D. S. 2006. Casein micelle structure: models and muddles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11:148–153.
3. Qi, P. X. 2007. Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Lait.* 87:363–383.
4. De Kruif, C. G. 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.* 81:3019–3028.
5. Dalgleish, D. G., P. A. Spagnuolo, and H. D. Goff. 2004. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *Int. Dairy J.* 14:1025–1031.
6. Horne, D. S. 1998. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.* 8:171–177.
7. Marchin, S., J. L. Putaux, F. Pignon, and J. Léonil. 2007. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultrasmall-angle x-ray scattering. *J. Chem. Phys.* 126:045101–045110.
8. De Kruif, C. G., and E. B. Zhulina. 1996. κ -casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids Surf. A.* 117:151–159.
9. Walstra, P. 1990. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73:1965–1979.
10. Tuinier, R., and C. G. De Kruif. 2002. Stability of casein micelles in milk. *J. Chem. Phys.* 117:1290–1295.
11. Dalgleish, D. G. 1998. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *J. Dairy Sci.* 81:3013–3018.
12. Alexander, M., L. F. Rojas-Ochoa, M. Leser, and P. Schurtenberger. 2002. Structure, dynamics, and optical properties of concentrated milk suspensions: an analogy to hard-sphere liquids. *J. Colloid Interface Sci.* 253:35–46.
13. Dalgleish, D. G. 2007. The casein micelle and its reactivity. *Lait.* 87:385–387.
14. Dalgleish, D. G. 1983. Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *J. Dairy Res.* 50:331–340.
15. Sandra, S., and D. G. Dalgleish. 2005. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *Int. Dairy J.* 15:1095–1104.
16. Huppertz, T., A. L. Kelly, and C. G. De Kruif. 2006. Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure. *J. Dairy Res.* 73:294–298.
17. Gebhardt, R., W. Doster, J. Friedrich, and U. Kulozik. 2006. Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. *Eur. Biophys. J.* V35:503–509.
18. Horne, D. S. 2003. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids Surf. A.* 213:255–263.
19. Pitkowski, A., T. Nicolai, and D. Durand. 2008. Scattering and turbidity study of the dissociation of casein by calcium chelation. *Biomacromolecules.* 9:369–375.
20. Karlsson, A. O., R. Ipsen, and Y. Ardo. 2007. Influence of pH and NaCl on rheological properties of rennet-induced casein gels made from UF concentrated skim milk. *Int. Dairy J.* 17:1053–1062.
21. Huppertz, T., and P. F. Fox. 2006. Effect of NaCl on some physico-chemical properties of concentrated bovine milk. *Int. Dairy J.* 16:1142–1148.
22. Huppertz, T., M. A. Smiddy, and C. G. De Kruif. 2007. Biocompatible micro-gel particles from cross-linked casein micelles. *Biomacromolecules.* 8:1300–1305.
23. Huppertz, T., and C. G. De Kruif. 2008. Structure and stability of nano-gel particles prepared by internal cross-linking of casein micelles. *Int. Dairy J.* 18:556–565.
24. Bonnet-Gonnet, C., L. Belloni, and B. Cabane. 1994. Osmotic pressure of latex dispersion. *Langmuir.* 10:4012–4021.
25. Carrière, D., M. Page, M. Dubois, T. Zemb, H. Colfen, et al. 2007. Osmotic pressure in colloid science: clay dispersions, catanionics, polyelectrolyte complexes and polyelectrolyte multilayers. *Colloids Surf. A.* 303:137–143.

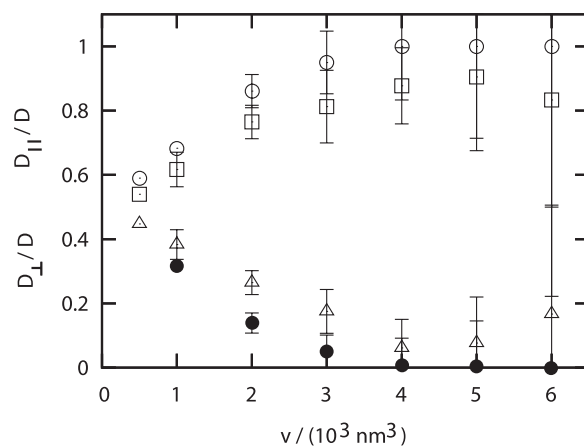
26. Parsegian, V. A., R. P. Rand, N. L. Fuller, and D. C. Rau. 1986. Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces. *Methods Enzymol.* 127:400–416.
27. Brans, G., C. G. P. H. Schroen, R. G. M. Van Der Sman, and R. M. Boom. 2004. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Membr. Sci.* 243:263–272.
28. Schuck, P. 2006. Spray drying of dairy products: a review. *New Food.* 1:14–20.
29. Farrer, D., and A. Lips. 1999. On the self-assembly of sodium caseinate. *Int. Dairy J.* 9:281–286.
30. HadjSadok, A., A. Pitkowski, T. Nicolai, L. Benyahia, and N. Moulai-Mostefa. 2008. Characterization of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids.* 22:1460–1466.
31. Radford, S. J., and E. Dickinson. 2004. Depletion flocculation of caseinate-stabilized emulsions: what is the optimum size of the non-adsorbed protein nano-particles? *Colloids Surf. A.* 238:71–81.
32. Famelart, M. H., F. Lepesant, F. Gaucheron, Y. Le Graët, and P. Schuck. 1996. PH-induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: influence of aqueous phase. *Lait.* 76:445–460.
33. Pierre, A., J. Fauquant, Y. Le Graët, M. Piot, and J. L. Maubois. 1992. Préparation de phosphocaseinate natif par microfiltration sur membrane. *Lait.* 72:461–474.
34. Muller-Buschbaum, P., R. Gebhardt, E. Maurer, E. Bauer, R. Gehrke, et al. 2006. Thin casein films as prepared by spin-coating: influence of film thickness and of pH. *Biomacromolecules.* 7:1773–1780.
35. Schuck, P., M. Piot, S. Méjean, Y. Le Graët, J. Fauquant, et al. 1994. Spray-drying of native phosphocaseinate obtained by membrane microfiltration. *Lait.* 74:375–388.
36. Segalen, P., M. Boule, and G. Gwozdz. 1985. Caseins and caseinates. In *Laits et produits laitiers. 2. Les produits laitiers, transformations et technologies.* F. M. Luquet, editor. Tec et Doc, Lavoisier, Paris. 147–155.
37. Gaucher, I., D. Mollé, V. Gagnaire, and F. Gaucheron. 2008. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids.* 22:130–143.
38. Gaucheron, F., D. Mollé, V. Briard, and J. Léonil. 1999. Identification of low molar mass peptides released during sterilization of milk. *Int. Dairy J.* 9:515–521.
39. Jenness, R., and J. Koops. 1962. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.* 16:153–164.
40. Gaiani, C., J. Scher, P. Schuck, J. Hardy, S. Desobry, and S. Banon. 2006. The dissolution behavior of native phosphocaseinate as a function of concentration and temperature using a rheological approach. *Int. Dairy J.* 16:1427–1434.
41. Eigel, W. N., C. J. Hofmann, B. A. Chibber, J. M. Tomich, T. W. Keenan, et al. 1979. Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:2244–2248.
42. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bonding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
43. Jeumink, T. J. M., and C. G. De Kruif. 1993. Changes in milk on heating: viscosity measurements. *J. Dairy Res.* 60:139–150.
44. Morris, G. A., T. J. Foster, and S. E. Harding. 2000. Further observations on the size, shape, and hydration of casein micelles from novel analytical ultracentrifuge and capillary viscometry approaches. *Biomacromolecules.* 1:764–767.
45. Snoeren, T. H. M., H. J. Klok, A. C. M. Van Hooydonk, and A. J. Damman. 1984. The voluminosity of casein micelles. *Milchwissenschaft.* 38:461–463.
46. Sood, S. M., K. S. Sidhu, and R. K. Dewan. 1976. Voluminosity of bovine and buffalo casein micelles at different temperatures. *Milchwissenschaft.* 31:470–474.
47. Vreeman, H. J., B. W. Van Markwijk, and P. Both. 1989. The structure of casein micelles between pH 5.5 and 6.7 as determined by light-scattering, electron microscopy and voluminosity experiments. *J. Dairy Res.* 56:463–470.
48. Walstra, P. 1979. The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *J. Dairy Res.* 46:317–323.
49. Muller-Buschbaum, P., R. Gebhardt, S. V. Roth, E. Metwalli, and W. Doster. 2007. Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophys. J.* 93:960–968.
50. Resmini, P., L. Pellegrino, R. Andreini, and F. Prati. 1989. Determination of milk whey proteins by reversed-phase HPLC. *Scienza Tecnica Lattiero-Casearia.* 40:7–23.
51. Dauphas, S., N. Mouhous-Riou, B. Metro, A. R. Mackie, P. J. Wilde, et al. 2005. The supramolecular organization of β -casein: effect on interfacial properties. *Food Hydrocolloids.* 19:387–393.
52. Leclerc, E., and P. Calmettes. 1997. Structure of β -casein micelles. *Physica B (Amsterdam).* 241–243:1141–1143.
53. O'Connell, J. E., V. Y. Grinberg, and C. G. De Kruif. 2003. Association behavior of β -casein. *J. Colloid Interface Sci.* 258:33–39.
54. Euston, S. R. 2004. Computer simulation of proteins: adsorption, gelation and self-association. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9:321–327.
55. Euston, S. R., and J. L. Nilsson. 2007. Simulating the self-association of caseins: towards a model for the casein micelle. *Lait.* 87:389–412.
56. Davies, D. T., and A. J. R. Law. 1983. Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *J. Dairy Res.* 50:67–75.
57. Vabinder, A. J., H. S. Rollema, A. Bot, and C. G. De Kruif. 2003. Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles. *J. Dairy Sci.* 86:1556–1563.
58. De Kruif, C. G., E. M. F. van Iersel, A. Vrij, and W. B. Russel. 1985. Hard sphere colloidal dispersions: Viscosity as a function of shear rate and volume fraction. *J. Chem. Phys.* 83:4717–4725.
59. Schaertl, W., and H. Sillescu. 1994. Brownian dynamics of polydisperse colloidal hard spheres: Equilibrium structures and random close packings. *J. Stat. Phys.* 77:1007–1025.
60. Russel, W. B., D. A. Saville, and W. R. Schowalter. 1989. *Colloidal Dispersions.* Cambridge University Press, Cambridge.
61. Karlsson, A. O., R. Ipsen, K. Schrader, and Y. Ardo. 2005. Relationship between physical properties of casein micelles and rheology of skim milk concentrate. *J. Dairy Sci.* 88:3784–3797.
62. Kaldasch, J., J. Laven, and H. N. Stein. 1996. Equilibrium phase diagram of suspensions of electrically stabilized colloidal particles. *Langmuir.* 12:6197–6201.
63. Carnahan, N. F., and K. E. Starling. 1969. Equation of state for nonattracting rigid spheres. *J. Chem. Phys.* 51:635–636.
64. Hansen, S., R. Bauer, S. B. Lomholt, K. B. Quist, J. S. Pedersen, et al. 1996. Structure of casein micelles studied by small-angle neutron scattering. *Eur. Biophys. J.* 24:143–147.
65. Holt, C., C. G. De Kruif, R. Tuinier, and P. A. Timmins. 2003. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids Surf. A.* 213:275–284.
66. Stothart, P. H., and D. J. Cebula. 1982. Small-angle neutron scattering study of bovine casein micelles and sub-micelles. *J. Mol. Biol.* 160:391–395.
67. Ashcroft, N. W., and J. Lekner. 1966. Structure and resistivity of liquid metals. *Phys. Rev.* 145:83.
68. Pignon, F., G. Belina, T. Narayanan, X. Paubel, A. Magnin, et al. 2004. Structure and rheological behavior of casein micelle suspensions during ultrafiltration process. *J. Chem. Phys.* 121:8138–8146.
69. McMahon, D. J., and B. S. Oommen. 2008. Supramolecular structure of the casein micelle. *J. Dairy Sci.* 91:1709–1721.
70. Reference deleted in proof.
71. Flory, P. J. 1969. *Principles of Polymer Chemistry.* Cornell University Press, Ithaca.

72. Hilderbrand, J. H., and R. L. Scott. 1950. Solubility of Nonelectrolytes. Reinhold Publishing Corporation, New York.
73. Lu, K., E. E. Brodsky, and H. P. Kavehpour. 2008. A thermodynamic unification of jamming. *Nat. Phys.* 4:404–407.
74. Holt, C., P. A. Timmins, N. Errington, and J. Leaver. 1998. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by beta-casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron-scattering measurements. *Eur. J. Biochem.* 252:73–78.
75. Steinbach, P. J., and B. R. Brooks. 1993. Protein hydration elucidated by molecular dynamics simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9135–9139.
76. Perez, J., J. M. Zanotti, and D. Durand. 1999. Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution. *Biophys. J.* 77:454–469.
77. Famelart, M. H., Y. Le Graët, and K. Raulot. 1999. Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl₂: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. *Int. Dairy J.* 9:293–297.

Corrections

Thorsten Auth and Nir S. Gov. 2009. Diffusion in a fluid membrane with a cortical cytoskeleton. *Biophys. J.* 96:818–813.

Figs. 6 *b* and 7 *b* are identical. The correct Fig. 7 *b* is immediately below. The labels of the y axis in both Fig. 6 *b* and Fig. 7 *b* should read ' $D_{\perp}/D'$ ' and ' $D_{\parallel}/D'$ '.



doi: 10.1016/j.bpj.2009.02.005

A. Bouchoux, P.-E. Cayemite, J. Jardin, G. Gésan-Guizieu, and B. Cabane. 2009. Casein micelle dispersions under osmotic stress. *Biophys. J.* 96:693–706.

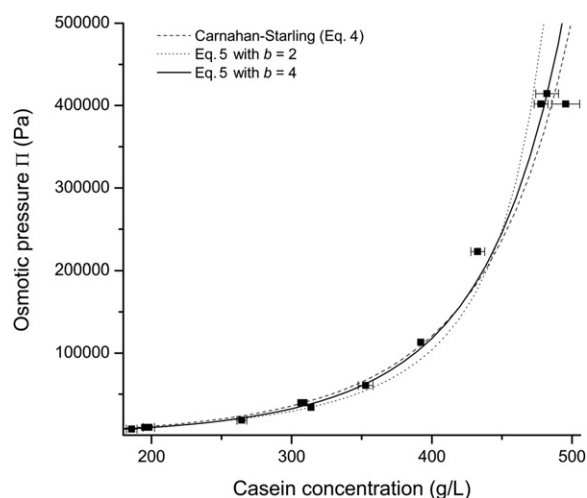
Parameter c in Eq. 1 was incorrect. Equation 1 should now read

$$\log \Pi = a + b[\text{PEG}]^c$$

with $a = 0.49$, $b = 2.5$, and $c = 0.24$

This is simply a typographical error, so it does not affect any of our results.

Also the equation numbers appearing in Fig. 8 should be corrected as follows:



The authors apologize for these errors.

doi: 10.1016/j.bpj.2009.02.006

Biophysical Journal, Volume 96

Supplementary Material

Casein Micelle Dispersions under Osmotic Stress

Antoine Bouchoux, Pierre-Emerson Cayemite, Julien Jardin, Geneviève Gésan-Guizieu, and Bernard Cabane

Supporting Information

Casein Micelle Dispersions under Osmotic Stress

Antoine Bouchoux^{*,#}, Pierre-Emerson Cayemitte^{*,#}, Julien Jardin^{*,#}, Geneviève Gésan-Guiziou^{*,#}, and Bernard Cabane[§]

^{*}INRA, UMR1253, STLO, F-35000 Rennes, France

[#]Agrocampus Rennes, UMR1253, F-35000 Rennes, France

[§]PMMH, CNRS UMR 7636, ESPCI, 10 rue Vauquelin, F-75231 Paris cedex 05, France

1. Materials

Urea-polyacrylamide gel electrophoresis

Samples were analysed by urea-polyacrylamide gel electrophoresis (urea-PAGE) using 18% (w/v) acrylamide gels comprising 4.33 M urea and 0.0375 M Tris-HCl buffer, pH 8.8, according to the method of Andrews et al. (1). A Mini Protean II gel system (BioRad, Ivry-sur Seine, France) was used. NPC dispersions were diluted between 1/5 and 1/20 in distilled water and 1 mL of the diluted dispersions were denatured with 0.5 mL 0.094 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing, 3.3 M urea, 5% (v/v) b-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol and 0.05% (w/v) bromophenol blue for 1 h at 37°C. 20 µL of sample were loaded into each lane. Electrophoresis was continued for 2.5 h at 20°C and 200 V constant voltage, using 0.5 M Tris-HCl, pH 8.3, containing 0.192 M glycine as the electrode buffer. The bands were revealed with R250 Coomassie blue staining.

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

Before chromatographic separation and analysis by MS, peptide enrichment and partial elimination of trichloroacetic acid (TCA), salts and lactose from the samples were carried out using Waters Sep-Pack Vac cartridges (Waters, Mildford, MA, USA) containing 200 mg of trifunctional C18 in 3 mL volume as packing material. The cartridge was conditioned with 10 volumes of deionised water, rinsed with 3 volumes of acetonitrile and with 10 volumes of deionised water containing 0.1% (w/w) TFA. Then 2 mL of sample was loaded on to the cartridge. The loaded cartridge was washed with 20 mL of deionised water and peptides were eluted with 3 volumes of pure acetonitrile. Deionised water was added to samples (1:1) and mixtures were lyophilized. The freeze-dried powder was dissolved in 1 mL of deionised water.

Analytical reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was carried out using an Agilent HP1100 chromatographic system (Agilent Technologies, Massy, France). Separation was performed on a Vydac 214TP5215 C4 column (5 µm particle size, 2.1 mm i.d × 150 mm length). The elution was carried out at 40°C and at a flow rate of 0.25 mL/min by a binary gradient with acetonitrile as an organic modifier. Solvent A contained 0.106% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in deionised water and solvent B contained 80% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) TFA in deionised water.

Samples were analyzed through on-line LC-MS. The column was initially equilibrated with 3% of solvent B. 50µL of samples were injected into the system and eluted by a linear gradient from 3% to 80% of solvent B in 46 minutes. Fragments were detected both by UV

absorbance at 214nm and mass spectrometry. Throughout on-line coupling, splitting of chromatographic flow was achieved by a low dead volume T-junction with 85% of the flow directed to the UV detector and 15% to the mass spectrometer. This split yielded a perfect superposition between UV and Total Ion Current (TIC) detections.

The mass spectrometer (API III+ SCIEX, Thornhill, Ontario, Canada) comprises a triple quadrupole equipped with an atmospheric pressure electrospray ionisation source. Analysis was carried out in positive detection mode. A 75 μ m sprayer was set at 4800 V to generate multiply-charged ions and orifice voltage (OR) was set to 100V. The nebulizer gas (Air) pressure was set around 0.5 MPa and the curtain gas (N₂) flow was set to 1.2 L/min. The instrument mass-to-charge (m/z) scale was calibrated with polypropylene glycols. Each scan was acquired over the range of m/z values from 500 to 2400 using a step size of 0.3 Da and a dwell time of 0.5 ms. Masses of fragments observed were calculated from multiply charged ions using the software BioMultiview 1.3.1 (MDS Sciex).

2. Results

Extent of casein degradation during osmotic stress experiments

Fig. 1 gives an overall view of casein degradation with time during osmotic stress experiments at osmotic pressures below 5000 Pa.

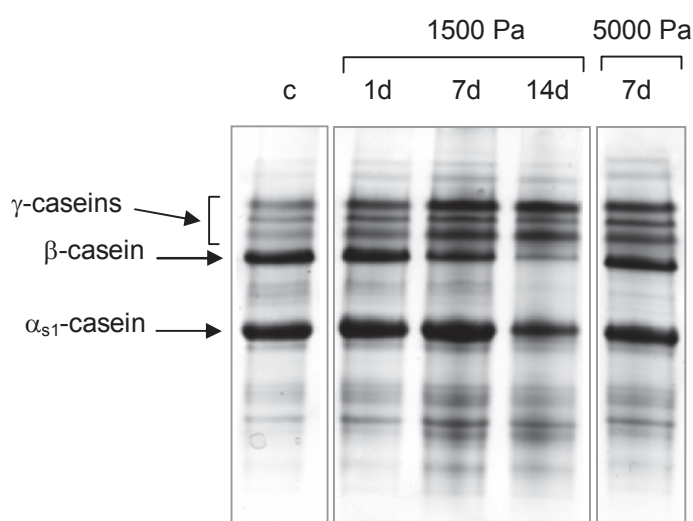


FIGURE 1 Urea-PAGE electrophoretograms for NPC dispersions in UF permeate after 1 day (1d); 7 days (7d); 14 days (14d) of osmotic compression at 20°C. As a control (c), the initial NPC dispersion before compression, at 25 g/L of caseins, is also shown. The osmotic pressures applied by the stressing solutions are indicated at the top.

γ-caseins are casein fragments from 15000 Da to 22000 Da that are formed by the proteolysis of β-casein (by plasmin for instance, see (2)). These fragments were already present in fresh NPC dispersions in small relative proportion as compared to "intact" β-casein and α_{s1}-casein. As incubation time increases, the relative proportion of γ-casein over β-casein increases so that the degradation is significant after 14 days of dialysis at 1500 Pa. However, after 7 days, the extent of proteolysis is still low for 1500 Pa and 5000 Pa. Based on these qualitative observations, osmotic compression were limited to 7 days at low osmotic pressures ($\Pi < 5000$ Pa), i.e. for casein concentrations at equilibrium below 150 g/L. This duration is a good

compromise between a relatively low degradation and a sufficient time for the thermodynamic equilibrium to be reached. At higher pressures ($\Pi \geq 8000$ Pa), virtually no degradation occurred at dialysis times comprised between 10 and 49 days and identical results (same casein concentrations) were obtained from dispersions at thermodynamic equilibrium but with different ages.

Low molar mass peptides identified in NPC dispersions

Following a protocol developed by Gaucheron et al. (3), the low molar mass peptides present in a NPC dispersion after 7 days of incubation at 20°C was identified by LC-MS. As casein degradation was significant only for osmotic pressures below 5000 Pa (previous section), a 25 g/L casein dispersion ($\Pi \approx 1500$ Pa) was chosen for these experiments. After 7 days of incubation at 20°C, the casein micelles were removed by ultracentrifugation at $70\,000 \times g$ for 2 h at 20°C in a Sorvall Discovery 90 SE ultracentrifuge (Hitachi, USA). Remaining proteins was then removed by precipitation in 12% (w/w) TCA and filtration on Whatman No. 40 filter paper. Fig. 2 gives the RP-HPLC profile obtained from this sample.

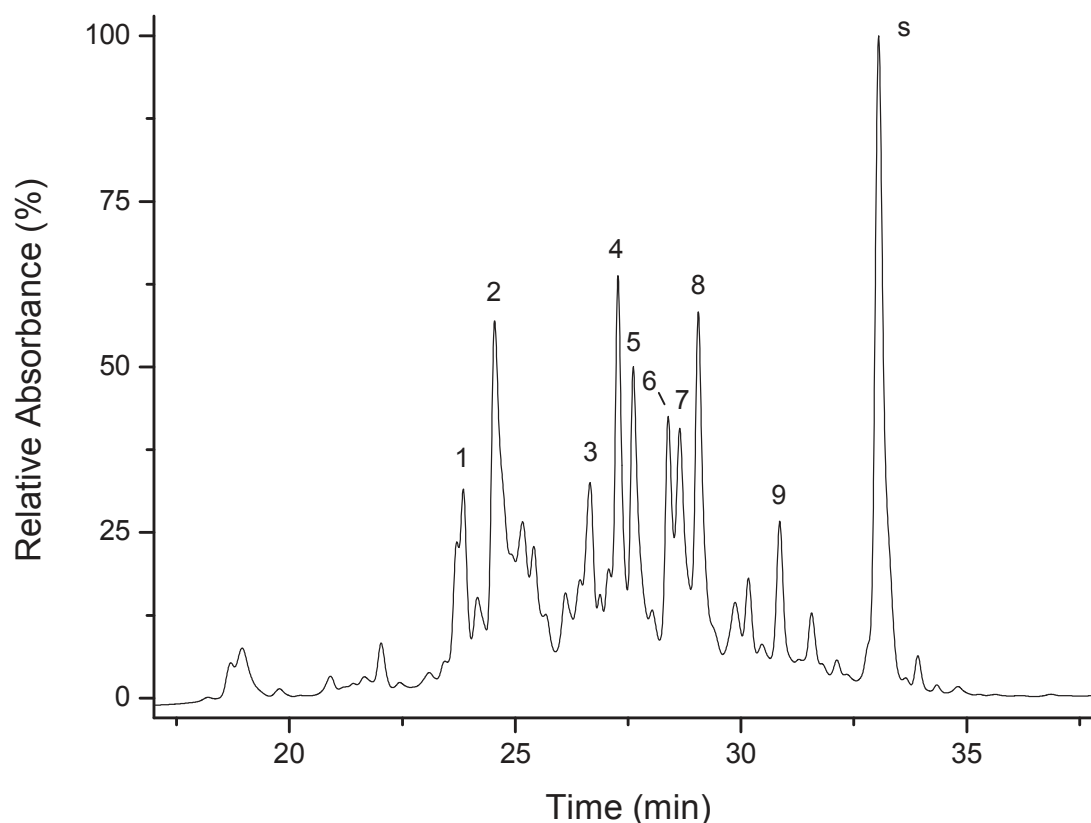


FIGURE 2 RP-HPLC profiles of the peptide fraction present in a 25 g/L casein dispersion of NPC in UF permeate after 7 days of incubation at 20°C. Eluted peaks were detected by UV absorbance at 214 nm. Peak numbers refer to Table 1.

The peak labelled "s" is the signal of the solvent, i.e. UF permeate (the RP-HPLC profile of UF permeate alone gave a unique peak of the same intensity at this elution time). It includes different species (small organics, modified serum proteins, etc.) that were not identified by MS due to their low ionisation efficiency. The heights of all other peaks are measured as percentages of peak "s" absorbance. Fig. 2 shows a group of sharp peaks located at elution

times between 27 and 32 minutes. These peaks are from small peptides in the range of 500-10000 Da. The exact molar masses of the main contributors to the total signal are given in Table 1. The amount of each species relative to the total peptide content was estimated from the RP-HPLC profile in Fig. 2.

TABLE 1 Identification of the major peptides present in a 25 g/L casein dispersion of NPC in UF permeate after 7 days of incubation at 20°C. Identification numbers are indicated in Fig. 2.

Identification number	Molar mass (Da)	Estimated relative amount (%)
1	2561	7.8
2	3135	14.1
3	970	8.1
4	1431	15.8
5	4168	12.4
6	2259	10.5
7	2678	10.1
8	1252 and 811	14.5
9	1109 or 2218	6.6

The same type of analysis was done with PEG stressing solutions after 7 days of dialysis equilibrium with the NPC dispersions. An example is given in Fig. 3 for a 2000 Pa stressing solution.

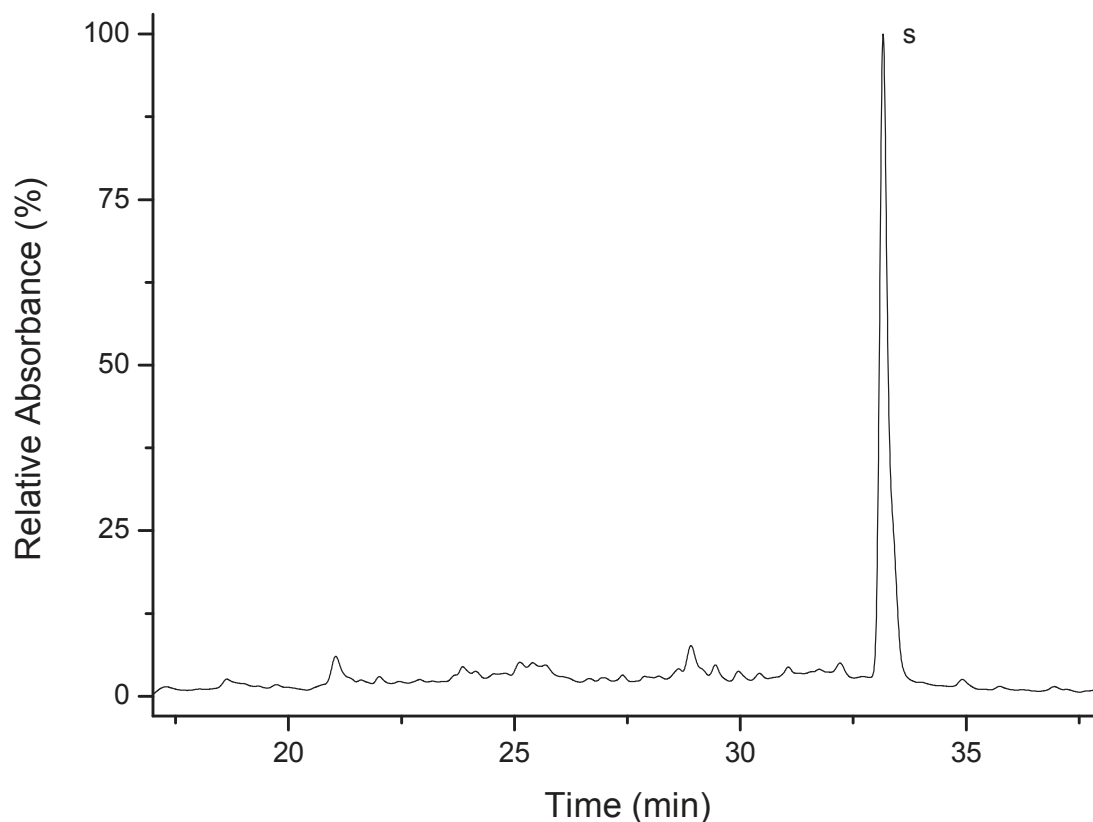


FIGURE 3 RP-HPLC profiles of a 2000 Pa stressing solution after 7 days of dialysis against a NPC dispersion at 20°C.

This spectrum only shows peak "s", that is the signal of UF permeate. The relative absence of any peptide peaks in this spectrum indicates that the peptides that are released by the NPC dispersion are retained within the dialysis bag, and therefore contribute to the osmotic pressure of the dispersion.

3. References

1. Andrews, A. T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50:45-55.
2. Eigel, W. N., C. J. Hofmann, B. A. Chibber, J. M. Tomich, T. W. Keenan, and E. T. Mertz. 1979. Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76:2244-2248.
3. Gaucheron, F., D. Molle, V. Briard, and J. Leonil. 1999. Identification of low molar mass peptides released during sterilization of milk. *Int. Dairy J.* 9:515-521.

Annexe C-2

Bouchoux et al., Biophysical Journal, 2010

How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles under Osmotic Stress, a SAXS Study

Antoine Bouchoux,^{†‡*} Geneviève Gésan-Guiziou,^{†‡} Javier Pérez,[§] and Bernard Cabane^{¶*}

[†]INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France; [‡]AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France; [§]Synchrotron SOLEIL, SWING, F-91192 Gif Sur Yvette, France, France; and [¶]PMMH, CNRS UMR7636, ESPCI, F-75231 Paris cedex 05, France

ABSTRACT By combining the osmotic stress technique with small-angle x-ray scattering measurements, we followed the structural response of the casein micelle to an overall increase in concentration. When the aqueous phase that separates the micelles is extracted, they behave as polydisperse repelling spheres and their internal structure is not affected. When they are compressed, the micelles lose water and shrink to a smaller volume. Our results indicate that this compression is non-affine, i.e., some parts of the micelle collapse, whereas other parts resist deformation. We suggest that this behavior is consistent with a spongelike casein micelle having a triple hierarchical structure. The lowest level of the structure consists of the CaP nanoclusters that serve as anchors for the casein molecules. The intermediate level consists of 10- to 40-nm hard regions that resist compression and contain the nanoclusters. Those regions are connected and/or partially merged with each other, thus forming a continuous and porous material. The third level of structure is the casein micelle itself, with an average size of 100 nm. In our view, such a structure is consistent with the observation of 10- to 20-nm casein particles in the Golgi vesicles of lactating cells: upon aggregation, those particles would rearrange, fuse, and/or swell to form the spongelike micelle.

INTRODUCTION

Casein micelles are probably one of the most common natural association colloids. They are complex macromolecular assemblies made of four distinct caseins, namely, α_{s1} , α_{s2} , β , and κ , and 8% in mass of phosphate and calcium ions. Casein micelles play a central role in the processing of milk, cheese, and most dairy products, and their structural and physical properties have been studied extensively over the last 50 years. Yet their structure is still a puzzle and is continuously the subject of furious debates among the scientific community (see reviews (1,2)). The problem is indeed difficult for a number of reasons. First, the casein micelles have a wide distribution of sizes: the average micelle has a diameter between 100 and 200 nm (3), but the full range and the exact form of the distribution are still not well established (4). Second, and more important, the internal structure of the casein micelle is made by the assembly of many components that are in complex equilibrium with their environment. Their interactions, and the interactions between the micelles themselves, may vary according to ionic conditions, temperature, and concentration. This makes the micelle a delicate and dynamic object that is not easy to observe in conditions that are representative of the native state. Finally, the assembly process that takes

place in the lactating cell cannot be fully reproduced *in vitro* (1), which makes it difficult to connect the micelle with building blocks from which it assembles.

At this time, it is now well established that the surface of the micelle is essentially made of a brush layer of κ -caseins (5). So the controversy is mainly focused on the internal structure of the casein micelle. Previous scattering and microscopy experiments (small-angle neutron scattering and small-angle x-ray scattering (SAXS), and transmission electron microscopy) have revealed some distinctive features of this internal structure (6–10). However, these features are not always identical and diverse models have been designed to account for the different results. As for now, the following models are still in use: 1), the submicelle model, which describes the micelle as made of closely packed submicelles of ~15 nm in diameter, either linked together by calcium phosphate (CaP) nanoclusters (11) or containing these nanoclusters (12); 2), the homogeneous model, in which the internal structure is made of a loose and uniform casein matrix with randomly distributed CaP nanoclusters (7); and 3), the core-shell model which still considers a homogeneous casein matrix but suggests that the CaP nanoclusters are preferentially located near the micelle surface (10).

This lack of a consensus indicates that there is a serious need for new and additional information. In this study, we report experiments that consist of examining the SAXS structure of the casein micelle in response to an osmotic stress. The osmotic stress technique makes it possible to concentrate casein dispersions to conditions where the micelles are closely packed and ultimately deform and deswell (13,14). During the concentration process, the chemical

Submitted July 16, 2010, and accepted for publication October 8, 2010.

*Correspondence: antoine.bouchoux@rennes.inra.fr or bcabane@pmmh.espci.fr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons-Attribution Noncommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>), which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Editor: Lois Pollack.

© 2010 by the Biophysical Society
0006-3495/10/12/3754/9 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.019

potential of all ions can be maintained at their values in the native state, thus preserving the integrity of the micelle. We show that the structural signature of the casein micelle is strongly affected by the change in concentration, and more particularly after close-packing, when the casein micelles are directly compressed and shrink to a lower volume. We then address two crucial questions: can we explain these changes using the models previously proposed for the internal structure of the micelle? If not, are we able to build a model that fits our SAXS data, is physically consistent, and remains realistic from a biological point of view?

MATERIALS AND METHODS

Proteins and dispersions preparation

Experiments were performed with dispersions made from native phosphocaseinate powder (NPC) dissolved in a solvent made from ultrafiltration of skimmed milk (UF). NPC powder is a serum protein-free milk powder in which the caseins and their associated minerals represent >90% of the total solid content. Such a powder is known to be an adequate model for native milk casein micelles and it has been used as such in a number of recent studies (15–17). The use of UF as solvent ensures that the chemical potentials of all ions are maintained at their values in the native state. In addition, important properties of the casein micelles in NPC + UF dispersions (size distribution, behavior toward pH gelation) are virtually identical to those measured in skimmed milk (18).

The NPC powder was prepared in our laboratory according to a protocol developed by Pierre et al. (19) and Schuck et al. (20) and described in a previous work (14). The UF was prepared through membrane ultrafiltration (5-kDa cutoff) of fresh skimmed milk. Its average ionic composition can be found in Jenness and Koops (21). UF also contains lactose (150 mM) and a few other low-molar-mass molecules such as riboflavin. Thimerosal and sodium azide, both purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France), were added to UF as preservatives at 0.02% and 0.1% (w/w), respectively.

For a casein concentration of up to 150 g/L, the dispersions were prepared by thoroughly mixing the NPC powder in UF for 15 h at 35°C. Dispersions at higher casein concentrations were prepared through osmotic stress, a concentration technique based on water exchange between the sample, i.e., a liquid NPC dispersion, and a reservoir of controlled osmotic pressure. A detailed description of the technique and the materials we used is given in our previous work (14). This technique made it possible to easily prepare ~1 mm³ homogeneous samples with casein concentrations of up to 400 g/L. The casein concentrations in the prepared samples were accurately determined through drying at 105°C. At 20°C, the pH of all dispersions matched the average pH of milk, i.e., pH 6.7 ± 0.1.

Small-angle x-ray scattering

SAXS measurements were performed at the French national synchrotron facility SOLEIL in Gif sur Yvette, France, in the beam line SWING operating at ~12 keV photon energy. Each sample, either liquid- or solidlike, was placed in a watertight cell with a cylindrical cavity of diameter 4.5 mm and thickness 2 mm closed by flat mica windows. The scattered intensity was recorded on a detector placed at ~6.5 m from the sample. For each sample, data were first recorded at short exposure time (typically ~0.2 s) to avoid any radiation damage (aggregation) that could result in artifacts at low q values. Subsequently, data were recorded at long exposure times (typically ~15 s) using a larger beam stop to obtain a good signal/noise ratio at high q values without damaging the detector. Intensities recorded at the two exposure times were then radially averaged and combined to get a scattering curve covering a q -range of 1.5×10^{-3} to $1.4 \times 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. In some cases, artifacts due to sample radiation damage

were visible in the low- q regions of the data recorded at long exposure times. The corresponding intensities were discarded before the merging procedure was carried out. For each sample, the intensity scattered from the solvent (UF) in the same mica cell was measured and subtracted from the casein sample pattern. The resulting corrected intensity is denoted by $I(q)$. All measurements were performed at room temperature (~23°C).

RESULTS

General structural features at native concentration

Fig. 1 shows the measured scattering intensities, $I(q)$, for casein micelle dispersions at the average casein concentration of bovine milk, $C = 25 \text{ g/L}$. Our results are compared with those of previous studies obtained at the same concentration but with slightly different model dispersions, namely fresh and pasteurized skimmed milk. At native concentration, the volume fraction occupied by the micelles is $\phi_{\text{eff}} \sim 0.1$ ($\phi_{\text{eff}} = Cv^*$, where v^* is the specific volume of an undeformed casein micelle, $v^* = 4.4 \text{ mL/g}$ (3)). In these conditions, the casein micelles are well separated from each other so that interparticle interactions are weak and do not perturb the structure of the micelles (10).

The SAXS profile shown in Fig. 1 for NPC powder rehydrated in a milk aqueous phase is practically identical to the profiles obtained from a fresh skimmed milk (8) or from a pasteurized skimmed milk (10). Therefore, the results reported here are representative of a micelle that is close to its native state, and NPC powder is an adequate model for milk casein micelles.

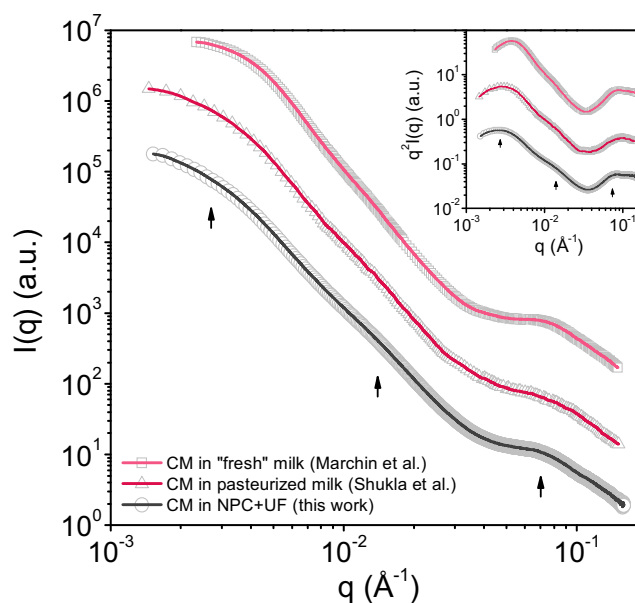


FIGURE 1 Typical SAXS profiles for the casein micelle at casein concentration ~25 g/L in fresh milk (squares; data from Marchin et al. (8)), pasteurized milk (triangles; data from Shukla et al. (10)), and NPC + UF (circles; this work). Intensities are in arbitrary units (a.u.) and the data have been shifted along the y-axis for clarity. (Inset) The corresponding Kratky plots in a log-log scale. The lines guide the eye.

The casein micelle exhibits a SAXS pattern with three characteristic features, numbered 0–2 (Fig. 1, arrows):

Level 0: low q values, up to $6 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$, distances $>100 \text{ nm}$. In this range, the signal is controlled by the distances between micelles, and by their overall shapes (22). The curvature of the scattering curves corresponds to the scattering expected from repelling polydisperse spheres at low volume fraction. This part of the scattering has been well described by previous authors (8,10,22,23), and it is not the focus of this work.

Level 1: intermediate q values, in the range 6×10^{-3} to $2 \times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$. In this range, a small oscillation is observed around $2\pi/q \approx 40 \text{ nm}$. This oscillation shows up better when the data are plotted as $I(q) \times q^2$ versus q on a so-called Kratky plot (inset of Fig. 1). This feature has been analyzed according to a core-shell model (10), or, alternatively, as resulting from the presence of a second population of very small casein micelles, called minimicelles (4,15,24,25)

Level 2: high q values, $\sim 7\text{--}8 \times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$. In this range, the variation in $I(q)$ originates from the presence of the $\sim 4\text{--}5\text{-nm}$ CaP nanoclusters. This was nicely demonstrated through SAXS experiments with casein micelles depleted in calcium (8,10).

Response to osmotic stress

Fig. 2, A and B, shows the SAXS intensities obtained in the concentration range $C = 25\text{--}400 \text{ g/L}$. In addition, the results at $C \geq 100 \text{ g/L}$ are displayed in Fig. 3 in terms of an effective structure factor, $S_{\text{eff}}(q)$, obtained by dividing $I(q)$ by the intensity scattered by the most dilute dispersion ($C = 25 \text{ g/L}$). $S_{\text{eff}}(q)$ is called effective because it takes into account all changes in shape and size of the micelles that result from the compression at high concentrations (26,27).

In a first concentration regime, i.e., $C = 25\text{--}150 \text{ g/L}$, the changes in $I(q)$ are restricted to the low- q region where the shoulder that corresponds to distances between micelles shifts toward shorter distances. In this regime, the dispersions are liquid and turbid (Fig. 2 A, upper inset). Viscosity and osmotic pressure measurements indicate that the micelles interact as repelling spheres with free volume

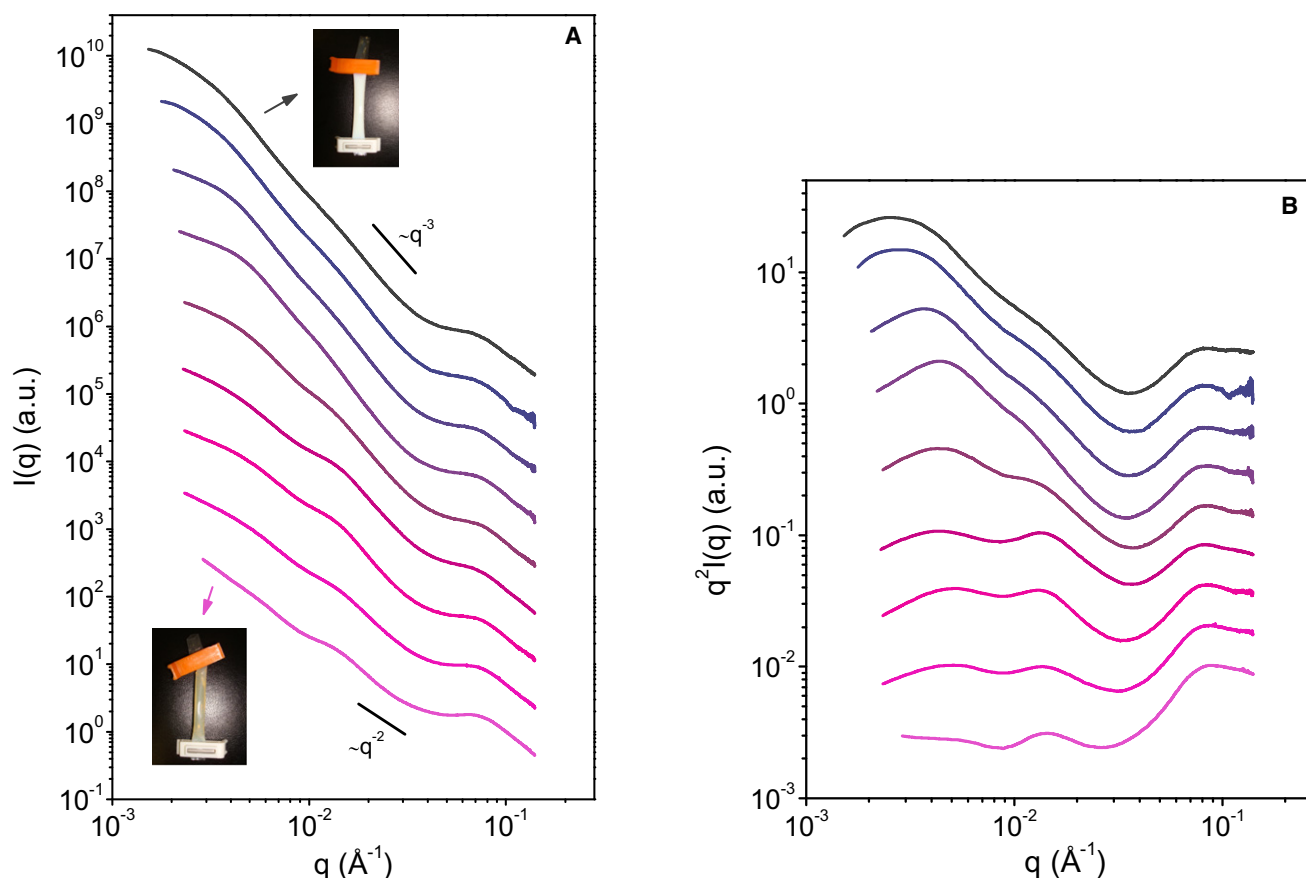


FIGURE 2 (A) The SAXS intensities of casein micelle dispersions at casein concentrations (top to bottom) 25, 33, 100, 150, 167, 206, 337, 365, and 400 g/L. The data have been shifted along the y-axis for clarity. At 25 g/L, the dispersion is turbid and fluid, whereas it is a nearly transparent gel at 400 g/L. The transition from a fluid to a gel takes place between 150 and 200 g/L of casein. (B) The corresponding Kratky plots in a log-log scale.

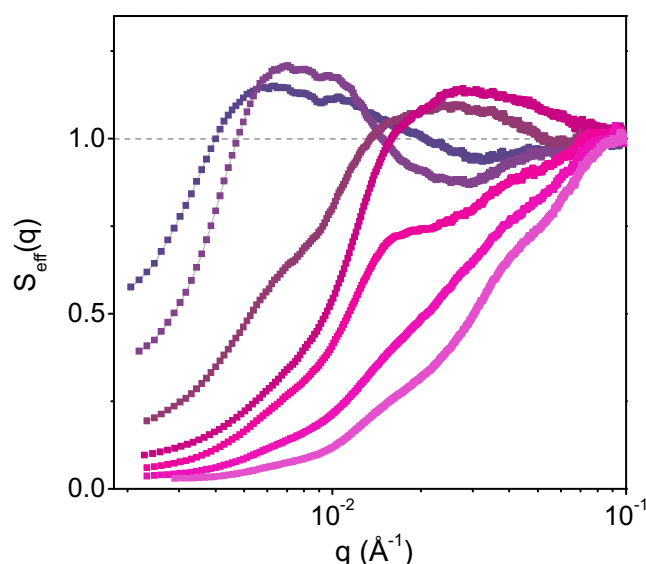


FIGURE 3 The effective structure factor $S_{\text{eff}}(q)$ measured for casein micelle dispersions at concentrations ≥ 100 g/L. Concentrations (top to bottom at low q values) are 100, 150, 167, 206, 337, 365, and 400 g/L.

between them (13,14). Therefore, only their relative positions are changed by compression. This is confirmed by the structure factor, $S_{\text{eff}}(q)$ (Fig. 3), which closely resembles those of concentrated dispersions of hard particles, or those of nanoemulsions (26,28). Hence, there are no changes of internal structure in this regime.

In a second concentration regime, i.e., at $C > 150$ g/L, corresponding to $\phi_{\text{eff}} > 0.65$, the increase in concentration produces changes that are much more significant. The main change is that the scattering curves clearly flatten as concentration increases: if we roughly approximate each spectrum by a power law $I(q) \approx q^{-d_f}$, the overall exponent d_f changes from $d_f \approx 3$ at 150 g/L to $d_f \approx 2$ at 400 g/L (Fig. 2, A and B). Another obvious point is that the $I(q)$ oscillation at intermediate q values becomes more prominent at increasing concentrations, while in the meantime, the shoulder at low q becomes less pronounced (Fig. 2, A and B). Finally, and quite remarkably, the position of the oscillation at intermediate q is not affected at all by the increase in concentration. All these changes in the scattering at intermediate q values must reflect changes in the internal structure of the micelles; they are correlated with major changes in the macroscopic properties of the dispersions. At the beginning of this second concentration regime, i.e., at $C = 150$ – 200 g/L, the osmotic pressure increases suddenly as the micelles strongly interact and progressively get into close contact (14). The dispersions then change from liquids to soft solids, as indicated from rheological experiments (13). At still higher concentrations, the micelles are in close packing and then tend to deform and deswell as concentration increases. These dispersions have the rheological properties of viscoelastic gels and show low turbidities (13,14) (Fig. 2 A, lower inset).

DISCUSSION

The aim of this section is to find a structural model for the casein micelle that is deformed under compression in a way that is consistent with the SAXS spectra shown in Fig. 2 A. In a first part, we demonstrate that the deformation of the micelle is of a very peculiar type (nonaffine), and that it cannot be described by any of the structural models previously proposed. We then show that a model that accurately accounts for this atypical behavior is a sponge model with three levels of structure.

A nonaffine deformation

In the first stage of compression, at $C \leq 150$ g/L, the micelles are separated from each other (13). The changes of $I(q)$ and $S_{\text{eff}}(q)$ are restricted to the low- q part of the scattering curves, and they match the usual behavior of repelling polydisperse hard spheres (26,28). Therefore, the only effect of the rise in concentration is a change in the relative positions of the micelles. This is not the focus of the work presented here.

At concentrations > 150 g/L, the SAXS spectra are much more interesting and informative. In this second concentration regime, the micelles are in contact, deform, and deswell as C increases. The changes in the shape of the spectra clearly indicate that the internal structure of the micelles is deformed in a way that is nonaffine with respect to the overall (macroscopic) compression. A first indication of this behavior is the observed flattening (d_f changes from ~ 3 to ~ 2 (Fig. 2 A)) of the spectra as C increases from 150 to 400 g/L. Indeed, an affine or homogeneous deformation, where all dimensions are affected through the same linear transformation, would induce an overall translation of the curve along the q -axis instead of a flattening. This first general nonaffine behavior is also seen in Fig. 3 where the depression of $S_{\text{eff}}(q)$ becomes very broad at $C > 150$ g/L and extends to q values that are well within the internal structure of the micelles. If we now consider the details of the spectra, another striking indication that the deformation is nonaffine is the fact that the positions of the $I(q)$ oscillations at intermediate and high q values do not change at all with compression (Fig. 2 B), so although the micelle deforms and shrinks to a smaller volume, the distances that characterize some substructures within the micelles remain constant.

At this point, the question is whether or not the structural models that already exist for the casein micelle can explain this nonaffine behavior. A careful analysis of each model suggests that the answer is no. The main points of this analysis are summarized below. Some additional information and calculations are given in Note S1 in the [Supporting Material](#):

Submicelle model. In this model, the micelle is made of closely packed submicelles of ~ 15 nm in diameter (11,12). Upon compression, these submicelles would

be forced to interact strongly and would ultimately deform and diminish in size. This would lead to strong and shifting correlation peaks at intermediate q values, which is not observed.

Homogeneous model. In this model, the internal structure is made of a loose and uniform casein matrix with randomly distributed CaP nanoclusters (7,8). A first obvious argument against this model is that it cannot explain the presence of the $I(q)$ oscillation at intermediate q values. In addition, the homogeneous model suggests that the casein micelles behave as some simple unstructured microgel particles upon compression, which is not verified (Note S1-1 in the [Supporting Material](#)).

Core-shell model. In this model, the CaP nanoclusters are preferentially located at the periphery of the micelle, thus forming a shell of higher electronic density (10). We have calculated the form factor for such a structure and considered different scenarios regarding its deformation (affine deformation, deformation of the core only, and deformation of the shell only). In each case, the $I(q)$ oscillation at intermediate q values shifts toward higher values and/or does not become more prominent as C increases (Note S1-2 in the [Supporting Material](#)).

Presence of minimicelles. In this scenario, a second population of smaller casein micelles is present in the dispersions (4). Because both the micelles and the minimicelles would be forced to interact, the oscillations at low and intermediate q values would change in the same way as C increases; and this is not the case. In addition, the concentration in minimicelles that is necessary to describe the intermediate $I(q)$ oscillation is too high to be realistic (Note S1-3 in the [Supporting Material](#)).

Sponge model

A way to explain the nonaffine deformation of the casein micelle is that both hard and soft regions coexist within its structure: under compression, the soft regions lose water and are compressed, whereas the hard regions are pushed closer together. The choice of a model consists of describing what these hard and soft regions are and how they are distributed within the micelle. It is quite obvious that the hard regions characterized by the $I(q)$ oscillation at high q values are the 4- to 5-nm CaP nanoclusters present in the micelle body. Then the central question is the physical meaning of the $I(q)$ oscillation at intermediate q values: what does it tell us about the structure of the micelle? Since the position of this oscillation does not shift when the micelle is compressed, it may correspond to another type of hard region that resists compression. Such regions, made of a number of nanoclusters with adsorbed casein

molecules, would be separated or connected by soft regions or voids that collapse under osmotic stress. This would make the casein micelle a sort of sponge, a term used by McMahon and Oomen in a recent publication when discussing transmission electron microscope images of the micelle (9).

The most general model that describes a heterogeneous or spongelike material containing hard and soft components is a cell model where the cells are randomly occupied by either type of component, according to the overall volume fractions of each. This has been used successfully with a cubic lattice or with an array of Voronoi cells to describe microemulsions (29–31). In this model, the intensity scattered by the material is

$$I(q) = \phi(1 - \phi)v_{cell}(\Delta\rho)^2P(q), \quad (1)$$

where ϕ is the volume fraction of occupied cells, v_{cell} the cell volume, $\Delta\rho$ the difference in scattering density between occupied and empty cells, and $P(q)$ the single-cell scattering function. In the simplest nonaffine deformation, the occupancy ϕ changes with C and the form factor $P(q)$ remains unchanged.

At low occupancies ($\phi \ll 1$), this intensity is proportional to ϕ , and at high occupancies, it goes as $1 - \phi$, as it should, since the scattering will be produced by the voids. Moreover, the only characteristic length is the cell size, which is taken into account by the single-cell scattering function $P(q)$. Since there are no correlations between the occupancies of neighboring cells, nor any voids between them, this model does not produce any of the correlation peaks that are observed for systems with repulsive interactions. In this respect, it appears well suited to analyze the scattering curves of casein micelles that show characteristic distances but no correlation peaks even at high volume fractions. For simplicity, we assume that the same description is applicable to the three levels of structure, i.e., the whole micelles (level 0), the hard regions (level 1) and the CaP nanoclusters (level 2). The expression of the scattered intensity then becomes

$$I(q) = a P_0(q) + b P_1(q) + c P_2(q), \quad (2)$$

with

$$a = \phi_0(1 - \phi_0)v_0(\Delta\rho_0)^2, \quad (3)$$

$$b = \phi_0\phi_1(1 - \phi_1)v_1(\Delta\rho_1)^2, \quad (4)$$

and

$$c = \phi_0\phi_1\phi_2(1 - \phi_2)v_2(\Delta\rho_2)^2. \quad (5)$$

This model is identical in its functional form (Eq. 2) to the Beaucage scattering function used by Pignon et al. (22) or the composed form-factor function used by Gebhardt et al.

(24). However, it has the advantage that it gives a precise physical meaning to the form factors $P_n(q)$ and to their prefactors a , b , and c . We assume here that $P_n(q)$ can be approximated by the form factors of polydisperse spheres. To calculate them, we use the expressions given by Aragon et al. for a Schulz size distribution of spheres of polydispersity σ_n and number average diameter d_n (32).

To test our model, we first perform a fit of the experimental data to Eq. 2 by simply varying the values of prefactors a – c and the mean diameters d_0 , d_1 , and d_2 used in the calculation of $P_n(q)$. To minimize the number of free parameters in the fits, we set the polydispersity values to realistic ones, i.e., $\sigma_0 = \sigma_1 = 1/3$ and $\sigma_2 = 0.2$. The agreement with the data is excellent at all concentrations (Fig. 4). The

parameters obtained from the fits are given in Table S4 in the Supporting Material.

In a second step, we use the concentration dependence of prefactors a – c to check whether the model is physically meaningful. For that purpose, the simplest approach consists in estimating the volume fractions ϕ_0 , ϕ_1 , and ϕ_2 from those prefactors and in examining the variations of each volume fraction with C . A detailed description of how we make our calculations is given in the Note S2 in the Supporting Material. For simplicity, we consider only the case for which the soft regions are voids filled with solvent and the hard regions contain all the CaP and protein materials. The resulting volume fractions are given in Fig. 5, A and B, as a function of casein concentration.

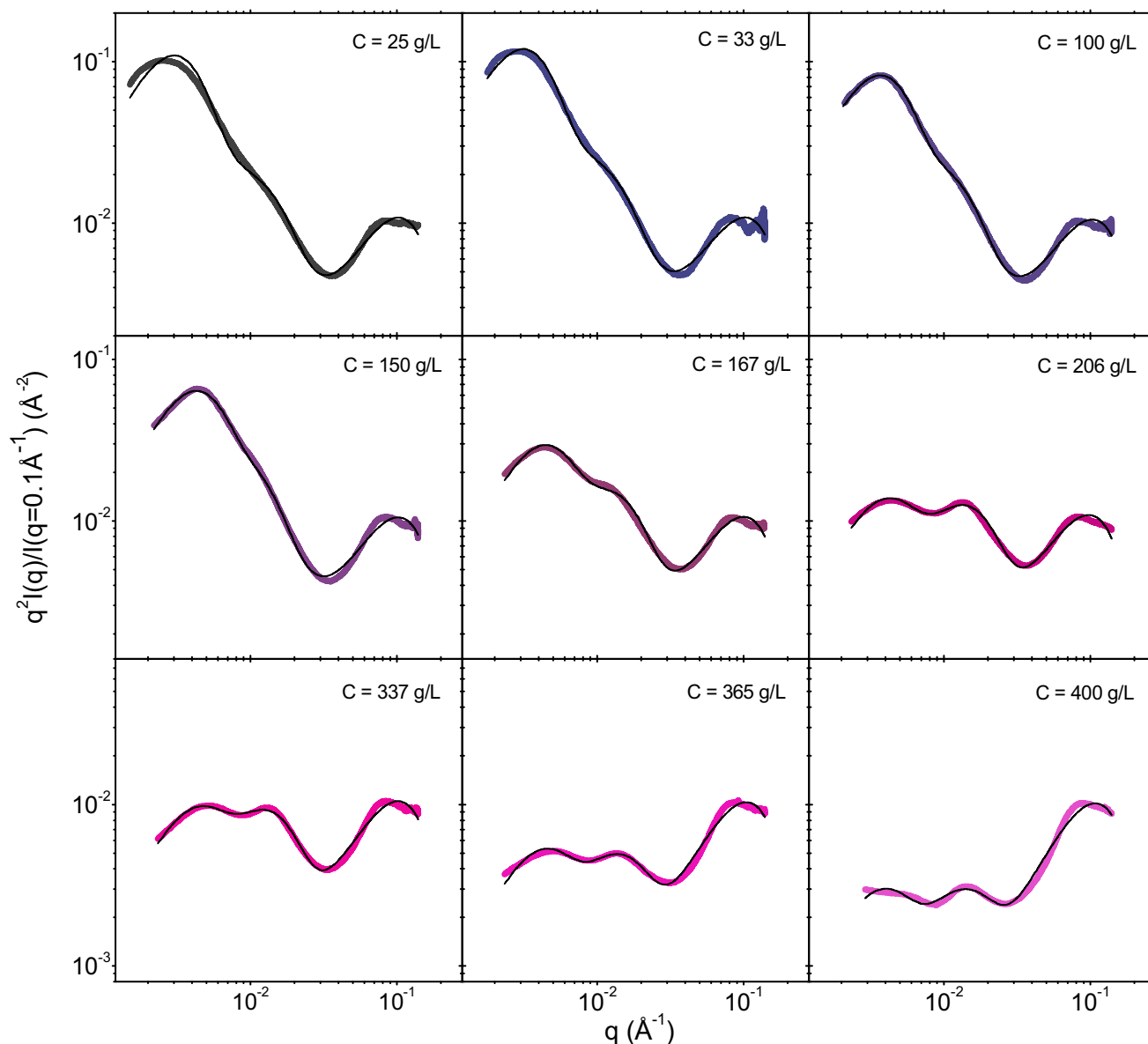


FIGURE 4 Modeling of the SAXS intensities of compressed casein micelle dispersions. Thick lines are the experimental data and thin black lines are the best fits to Eq. 2 (see text). See Fig. S8 for another representation of these modeling results.

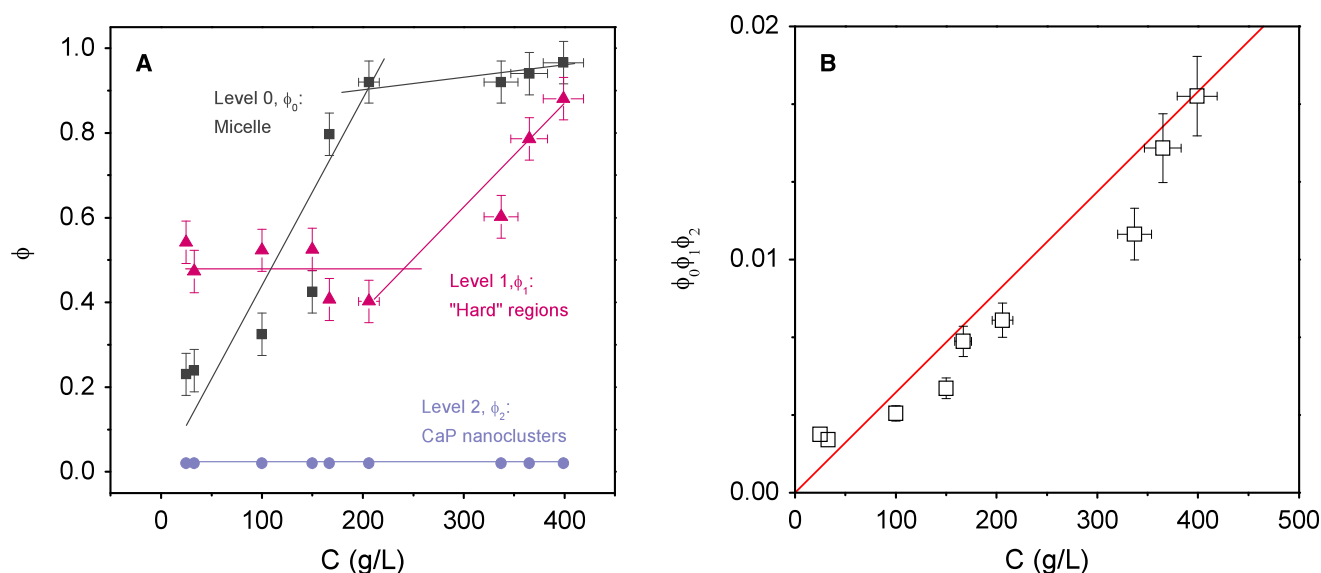


FIGURE 5 Consistency of the model. (A) The casein concentration dependence of the volume fractions obtained from the best fits of the model to the SAXS data. Those volume fractions characterize the volume occupied by the micelles in the dispersions (ϕ_0 , squares), the hard regions in the micelle (ϕ_1 , triangles), and the CaP nanoclusters in the hard regions (ϕ_2 , circles). The lines guide the eye. (B) The casein concentration dependence of the product ($\phi_0\phi_1\phi_2$) (open squares). The data agree well with the volume fraction occupied by the CaP nanoclusters in the dispersions, ($\phi_0\phi_1\phi_2 \approx 0.01Cv^*$) (solid line).

It is clear that the individual variations of ϕ_0 , ϕ_1 , and ϕ_2 with C are consistent with a heterogeneous micelle made of hard regions that contain the CaP nanoclusters (Fig. 5 A):

Level 0, whole micelle: at low concentrations, when the micelles are not yet compressed, ϕ_0 increases roughly linearly with C , in good agreement with the specific volume of the native micelle, $v^* = 4.4$ mL/g ($\phi_0 = v^*C$ (Fig. 5 A)). Then when the micelles are in contact and fill almost all the space in the dispersions, ϕ_0 remains about constant at values close to 1.

Level 1, hard regions: as opposed to ϕ_0 , ϕ_1 remains constant at low concentrations where the micelles are not yet compressed. Then, when the micelles are in contact, these hard regions are being pushed closer together as solvent is expelled from the micelle and ϕ_1 increases with C . From our estimations, these 10- to 40-nm hard regions make up ~50% of the volume of the micelle at native concentration, $C = 25$ g/L. This corresponds to ~30 of hard regions (between 8 and 500 if we consider their strong polydispersity in size) in a micelle of 100 nm in diameter. At the highest compression ($C = 400$ g/L), $\phi_1 \approx 0.9$, meaning the hard regions occupy nearly the whole micelle volume.

Level 2, CaP nanoclusters: the volume fraction ϕ_2 occupied by the CaP in the hard regions is constant at ~0.02 at all concentrations. This is consistent with hard regions that resist compression and are not yet compressed in the concentration range investi-

gated. The calculated value of $\phi_2 \approx 0.02$ indicates that an average hard region of ~25 nm in diameter contains ~7 CaP nanoclusters.

An additional and important indication of the consistency of our model is the overall evolution of the product ($\phi_0\phi_1\phi_2$) with casein concentration (Fig. 5 B). In theory, this product is indeed equal to the CaP volume fraction in the dispersions, a quantity that can be estimated quite simply from the CaP mass fraction in the native micelle (7). Again, the accordance between the ($\phi_0\phi_1\phi_2$) values calculated from the model and their theoretical variation is very satisfactory.

On a conceptual point of view, our sponge model then appears to be valid. So as a sponge, the casein micelle would be composed of hard regions of a certain characteristic size (10–40 nm) that are connected or partially merged which each other and form a continuous and porous material. Fig. 6 gives a schematic view of the resulting structure (see Fig. S11 for a picture of how this structure is modified upon compression). Compared to previous works, it is clear that this structural model is more complex than the submicelle (11,12), homogeneous (7,8), and core-shell models (10). However, introducing such a complexity is necessary, since none of these models are able to accurately describe the behavior of the micelle under compression. The deformation of the micelle is of a very peculiar type and our sponge model is able to describe it through the collapsing of voids that separate hard regions. On a biological point of view, such a heterogeneous and hierarchical structure is quite consistent with the observation of 10- to 20-nm casein particles in the Golgi vesicles of lactating cells (33): upon

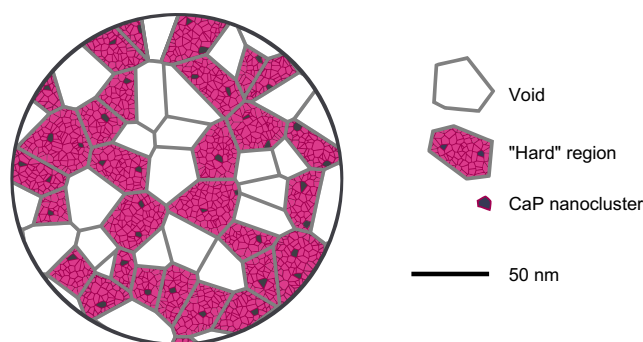


FIGURE 6 Highly schematic picture of a cross section of a 200-nm casein micelle according to the sponge model. The micelle is made of soft and hard regions represented here as Voronoi cells of ~25 nm in size. The soft regions are voids filled with solvent and the hard regions contain all the CaP and protein materials. According to our description of the model, the hard regions are also decomposed into cells that contain either one CaP nanocluster (*dark cells*) or casein molecules and solvent (*lighter cells*).

aggregation, those casein particles would rearrange, fuse, and/or swell to form the spongelike micelle.

CONCLUSIONS

Casein micelles are soft objects that respond to changes in their environment. In particular, their structure is deformed by compressive forces such as osmotic stress or the forces exerted in any concentration or filtration process. We have shown through SAXS that this deformation is nonaffine, i.e., some parts of the micelle collapse, whereas other parts resist deformation. None of the structural models previously proposed for the casein micelle can account for the deformations observed through SAXS. However, we show that a model made of random cells, in which some cells are filled and incompressible, whereas others are empty and collapse under pressure, can reproduce this type of deformation. We call this model the sponge model and we show that the spongelike micelle has a triple hierarchical structure (Fig. 6). The lowest level of the structure consists of the CaP nanoclusters that serve as anchors for the casein molecules. The intermediate level consists of hard regions ranging in size from 10 to 40 nm that occupy about half of the micelle volume at native concentration $C = 25$ g/L. Those regions are connected and/or partially merged with each other, thus forming a continuous and porous material. Each hard region contains an average of around seven nanoclusters, with considerable variation as the width of the distribution of volumes is $>50\%$. The third level of structure is the casein micelle, which contains ~30 of hard regions, again with a considerable polydispersity.

In future studies, it would be interesting to examine how the structure of the micelle is perturbed when both osmotic pressure and composition of the aqueous phase are changed. Such experiments would help in identifying the nature of the

interactions that stabilize the micellar edifice and that are responsible for its peculiar structure.

SUPPORTING MATERIAL

Additional information about the structural models discussed in this work is available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(10\)01269-5](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(10)01269-5).

We thank M. Van Audenaege for her help in the preparation of the samples for SAXS analysis, and J. Léonil and R. Botet for interesting discussions. We are also grateful to J. Fauquant, F. Garnier-Lambrouin, N. Leconte, and P. Schuck from UMR1253 for preparing and providing us with the NPC powder and the UF permeate of skimmed milk.

REFERENCES

- Farrell, J., E. L. Malin, ..., P. X. Qi. 2006. Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11:135–147.
- Horne, D. S. 2006. Casein micelle structure: models and muddles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11:148–153.
- De Kruif, C. G. 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.* 81:3019–3028.
- Müller-Buschbaum, P., R. Gebhardt, ..., W. Doster. 2007. Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophys. J.* 93:960–968.
- De Kruif, C. G., and E. B. Zhulina. 1996. κ -casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 117:151–159.
- Kumosinski, T. F., H. Pessen, ..., H. Brumberger. 1988. Determination of the quaternary structural states of bovine casein by small-angle x-ray scattering: submicellar and micellar forms. *Arch. Biochem. Biophys.* 266:548–561.
- Holt, C., C. G. De Kruif, ..., P. A. Timmins. 2003. Substructure of bovine casein micelles by small-angle x-ray and neutron scattering. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 213:275–284.
- Marchin, S., J. L. Putaux, ..., J. Léonil. 2007. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultrasmall-angle x-ray scattering. *J. Chem. Phys.* 126:045101–045110.
- McMahon, D. J., and B. S. Oommen. 2008. Supramolecular structure of the casein micelle. *J. Dairy Sci.* 91:1709–1721.
- Shukla, A., T. Narayanan, and D. Zanchi. 2009. Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter.* 5:2884–2888.
- Schmidt, D. G. 1982. Association of caseins and casein micelle structure. In *Developments in Dairy Chemistry, Vol. 1*. P. F. Fox, editor. Elsevier Applied Science, London. 61–86.
- Walstra, P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.* 9:189–192.
- Bouchoux, A., B. Debbou, ..., B. Cabane. 2009. Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions. *J. Chem. Phys.* 131:165106–165111.
- Bouchoux, A., P. E. Cayemite, ..., B. Cabane. 2009. Casein micelle dispersions under osmotic stress. *Biophys. J.* 96:693–706.
- Gebhardt, R., S. V. Roth, ..., P. Müller-Buschbaum. 2010. Structural changes of casein micelles in a rennin gradient film with simultaneous consideration of the film morphology. *Int. Dairy J.* 20:203–211.
- Huppertz, T., M. A. Smiddy, and C. G. de Kruif. 2007. Biocompatible micro-gel particles from cross-linked casein micelles. *Biomacromolecules.* 8:1300–1305.

17. Metwalli, E., J. F. Moulin, ..., P. Müller-Buschbaum. 2009. Hydration behavior of casein micelles in thin film geometry: a GISANS study? *Langmuir*. 25:4124–4131.
18. Famelart, M. H., F. Lepesant, ..., P. Schuck. 1996. pH-induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: influence of aqueous phase. *Lait*. 76:445–460.
19. Pierre, A., J. Fauquant, ..., J. L. Maubois. 1992. Native micellar casein separation through cross flow membrane microfiltration. *Lait*. 72:461–474.
20. Schuck, P., M. Piot, ..., J. L. Maubois. 1994. Spray-drying of native phosphocaseinate obtained by membrane microfiltration. *Lait*. 74:375–388.
21. Jenness, R., and J. Koops. 1962. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.* 16:153–164.
22. Pignon, F., G. Belina, ..., G. Gésan-Guiziou. 2004. Structure and rheological behavior of casein micelle suspensions during ultrafiltration process. *J. Chem. Phys.* 121:8138–8146.
23. Pitkowski, A., T. Nicolai, and D. Durand. 2008. Scattering and turbidity study of the dissociation of casein by calcium chelation. *Biomacromolecules*. 9:369–375.
24. Gebhardt, R., M. Burghammer, ..., P. Müller-Buschbaum. 2008. Structural changes of casein micelles in a calcium gradient film. *Macromol. Biosci.* 8:347–354.
25. Gebhardt, R., M. Burghammer, ..., P. Müller-Buschbaum. 2010. Investigation of surface modification of casein films by rennin enzyme action using micro-beam grazing incidence small angle x-ray scattering. *Dairy Sci. Technol.* 90:75–86.
26. Mason, T. G., S. M. Graves, ..., M. Y. Lin. 2006. Effective structure factor of osmotically deformed nanoemulsions. *J. Phys. Chem. B*. 110:22097–22102.
27. Mattsson, J., H. M. Wyss, ..., D. A. Weitz. 2009. Soft colloids make strong glasses. *Nature*. 462:83–86.
28. Graves, S., K. Meleson, ..., T. G. Mason. 2005. Structure of concentrated nanoemulsions. *J. Chem. Phys.* 122:134703–134706.
29. Auvray, L., J. P. Cotton, ..., C. Taupin. 1984. Concentrated Winsor microemulsions: a small angle x-ray scattering study. *J. Phys. France*. 45:913–928.
30. De Gennes, P. G., and C. Taupin. 1982. Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces. *J. Phys. Chem.* 86:2294–2304.
31. Talmon, Y., and S. Prager. 1978. Statistical thermodynamics of phase equilibria in microemulsions. *J. Chem. Phys.* 69:2984–2991.
32. Aragon, S. R., and R. Pecora. 1976. Theory of dynamic light scattering from polydisperse systems. *J. Chem. Phys.* 64:2395–2404.
33. Clermont, Y., L. Xia, ..., L. Hermo. 1993. Transport of casein submicelles and formation of secretion granules in the Golgi apparatus of epithelial cells of the lactating mammary gland of the rat. *Anat. Rec.* 235:363–373.

Biophysical Journal, Volume 99

Supporting Material

Title: How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles under Osmotic
Stress, a SAXS
Study

Authors: Antoine Bouchoux, Geneviève Gésan-Guiziou, Javier Pérez,
and
Bernard Cabane

Supporting Material

How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles under Osmotic Stress, a SAXS Study

Antoine Bouchoux,^{†,*,} Geneviève Gésan-Guiziou,^{†,‡} Javier Pérez,[§] and Bernard Cabane^{¶*}

[†]INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France;

[‡]Agrocampus Ouest, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France; [§]Synchrotron SOLEIL, Orme Merisiers, F-91192 Gif Sur Yvette, France; and [¶]PMMH, CNRS UMR7636, ESPCI, F-75231 Paris cedex 05, France

*Correspondence: antoine.bouchoux@rennes.inra.fr and bcabane@pmmh.espci.fr

Note S1: Quantitative evaluation of structural models

S1-1 Homogeneous model

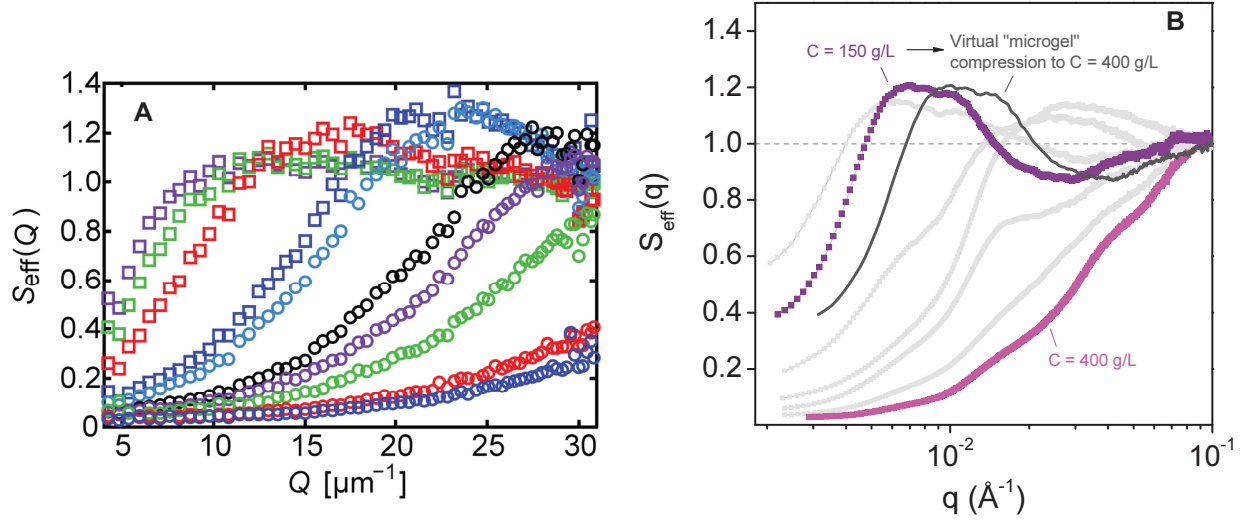


FIGURE S1 (A) Mattsson *et al.* (1): $S_{\text{eff}}(q)$ for a suspension of microgels at $\phi_{\text{eff}} = 0.12$ ($\square$), 0.15 ($\square$), 0.29 ($\square$), 0.75 ($\square$), 0.89 ($\circ$), 1.5 ($\circ$), 1.83 ($\circ$), 2.4 ($\circ$), 3.6 ($\circ$), 4.2 ($\circ$). (B) This work: $S_{\text{eff}}(q)$ for casein micelle dispersions. The purple and pink curves are the experimental data for $C = 150$ and 400 g/L, respectively.

The *homogeneous* model describes the casein micelle as a homogeneous network of casein macromolecules that is cross-linked by randomly located CaP nanoclusters (2,3). Under compression, such a network would behave as the microgel particles studied by Mattsson *et al.* (1), which are uniformly compressed and do not interpenetrate. This behavior is characteristic of an affine deformation in which all distances shrink by the same factor.

In order to quantitatively analyse the deformation field, we follow the analysis of Mattsson *et al.* (1), and we define an effective structure factor $S_{\text{eff}}(q)$ as the ratio of the scattered intensities in the concentrated and in the dilute dispersion. Fig. S1 A shows the variation of $S_{\text{eff}}(q)$ for the microgel particles, reproduced from ref. (1). In the dilute dispersions, $S_{\text{eff}}(q)$ shows a depression followed by a peak, caused by the correlations of positions of neighboring microgel particles. In concentrated dispersions, $S_{\text{eff}}(q)$ is essentially translated along to higher q values, as all distances between and within the microgel particles shrink by the same ratio.

Fig. S1 B compares the prediction for the *homogeneous* model with the experimental SAXS curves of the casein micelles. The purple curve is the structure factor at a concentration $C = 150$ g/L ($\phi_{\text{eff}} \approx 0.66$), where the micelles are closely packed but not yet deformed by the compression. The solid black line is the prediction for a compression to $C = 400$ g/L of this dispersion, according to an affine deformation, as expected for a crosslinked gel particle. The pink curve is the experimental structure factor of casein micelles. The very broad depression observed in the experimental $S_{\text{eff}}(q)$ indicates that the deformation of the micelle is not affine. Contrary to the prediction of the *homogeneous* model, there must be dense and less dense regions within the micelle, and the broad depression is caused by the collapse of the less dense regions.

S1-2 Core-shell model

"In silico" compression of a core-shell structure: a form-factor analysis

The simple core-shell model presented here is inspired from the recent work of Shukla *et al.* (4). The casein micelle is considered as a polydisperse particle made of a uniform casein matrix that contains CaP nanoclusters. The nanoclusters are located more preferentially at the periphery of the micelle, forming the "shell" of higher electron density than the internal "core". As in the work of Shukla *et al.*, we considered that the scattered intensity is the sum of two contributions:

$$I(q) = I_{cs}(q) + I_{nc}(q) \quad (S1)$$

with $I_{cs}(q)$ the intensity scattered by the polydisperse core-shell particles and $I_{nc}(q)$ the intensity scattered by the CaP nanoclusters.

Both contributions were estimated using the SASfit software package (5). For $I_{nc}(q)$, a model of hard spheres with a log-normal distribution was used. For $I_{cs}(q)$, the "Spherical Shell ii" structural model was used (depicted in Fig. S2), assuming a log-normal distribution of global radii as well. Particle interactions were ignored in the calculations so that the calculated scattering intensities correspond to the form factor of the particle.

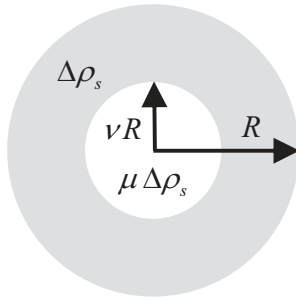


FIGURE S2 The "Spherical Shell ii" SASfit structural model. This structure is characterized through 2 size (R , μ) and 2 contrast (ν , $\Delta\rho_s$) parameters. For clarity, we use the same terminology as in the SASfit software.

The model was first used to fit the data obtained at low concentration ($C = 25$ g/L). A very good fit was obtained with the parameters listed in Table S1 (Fig. S3 A, B and C).

TABLE S1 Parameters values obtained from the fit of the *core-shell* model to the experimental data at $C = 25$ g/L. We set the contrast of the CaP nanoclusters at 1 (arbitrary unit, a.u.) and we considered that the CaP nanoclusters number density was 1000 times greater than the casein micelle number density (there are ~ 1000 CaP nanoclusters in an average micelle (2)).

Core-shell structure		Nanoclusters	
Number density, N_i (a.u.)	3.34×10^{-12}	N_{nc} (a.u.)	3.34×10^{-9}
Average radius, R_i (nm)	34.6	R_{nc} (nm)	1.7
Polydispersity σ_{cs}	0.4	σ_{nc}	0.2
ν_i	0.69	-	-
μ_i	0.45	-	-
$\Delta\rho_{s,i}$ (a.u.)	0.21	$\Delta\rho_{nc}$ (a.u.)	1

Compressions "in silico" were then performed by calculating the intensity scattered by the same object after compression. For that purpose, we estimated the new SASfit input parameters using the following general equations:

$$R_f = \alpha R_i \quad (\text{S2})$$

$$\Delta\rho_{s,f} = \Delta\rho_{s,i} \frac{(1 - \nu_i^3)}{\alpha^3 (1 - \nu_f^3)} \quad (\text{S3})$$

$$\mu_f = \mu_i \frac{\nu_i^3 (1 - \nu_f^3)}{\nu_f^3 (1 - \nu_i^3)} \quad (\text{S4})$$

with i standing for the initial state and f for the state after compression. For $C = 400$ g/L dispersion, we estimated α to be comprised between 0.7 and 0.85; assuming the micelle actually deforms between 150 g/L ($\phi \approx 0.66$) and 230 g/L ($\phi \approx 1$), respectively.

It was also necessary to consider three possible scenarios regarding the deformation of the core-shell structure, each scenario giving an additional relationship between ν_i and ν_f :

. *Affine deformation* (the shell and the core are equally compressed)

$$\nu_f = \nu_i \quad (\text{S5})$$

. *Deformation of the shell only* (the core is intact)

$$\nu_f = \frac{\nu_i}{\alpha} \quad (\text{S6})$$

. *Deformation of the core only* (the shell thickness is constant)

$$\nu_f = 1 - \frac{1 - \nu_i}{\alpha} \quad (\text{S7})$$

TABLE S2 The input parameters values calculated from Eqs. S2 to S7 and used for the SASfit calculations. N_i , σ_{cs} , and the nanoclusters parameters values were taken from Table S1. In the second scenario, the maximum compression is attained at $\alpha = 0.78$ when the shell thickness equals the diameter of a CaP nanocluster.

	Affine deformation		Shell deformation		Core deformation	
	$\alpha = 0.85$	$\alpha = 0.7$	$\alpha = 0.85$	$\alpha = 0.78$	$\alpha = 0.85$	$\alpha = 0.7$
R_f (nm)	29.4	24.3	29.4	27.1	29.4	24.3
ν_f	0.69	0.69	0.81	0.88	0.63	0.55
μ_f	0.45	0.45	0.19	0.10	0.64	1.06
$\Delta\rho_{s,f}$ (a.u.)	0.34	0.61	0.49	0.90	0.31	0.49

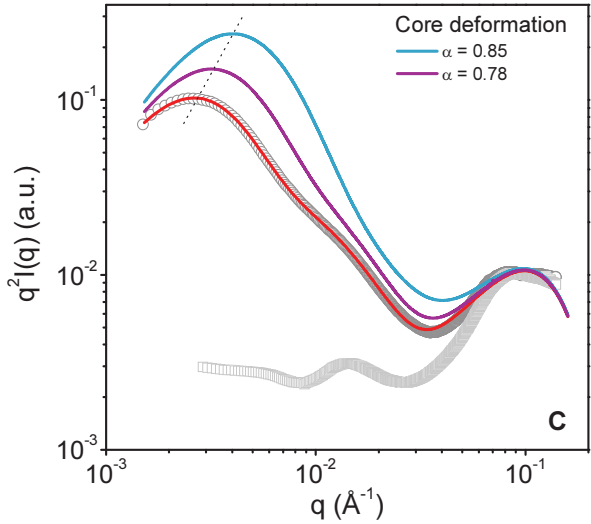
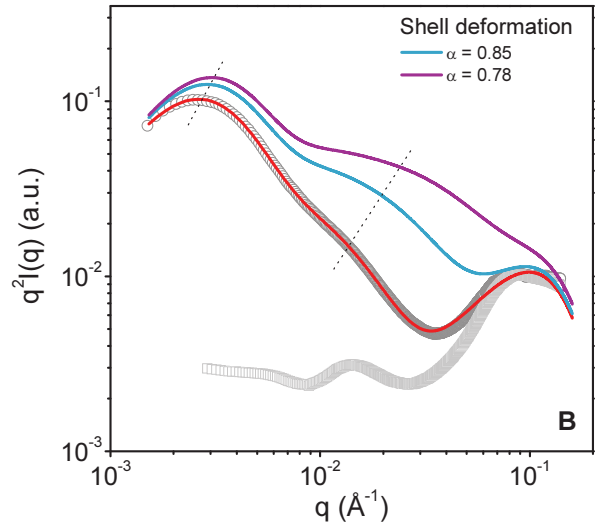
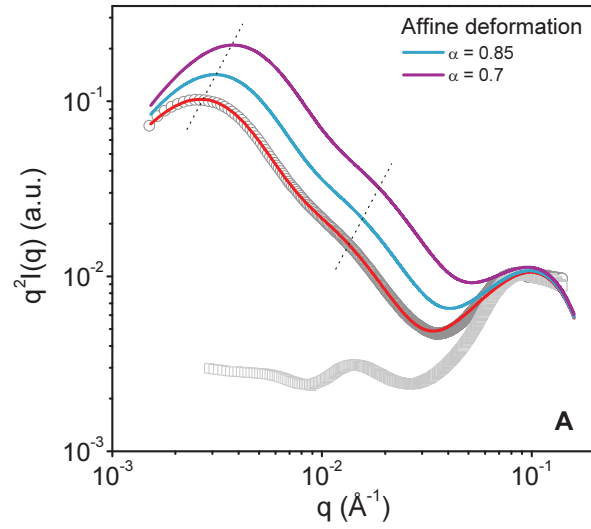


FIGURE S3 The SASfit calculated intensity for a core-shell structure under compression: (A) affine deformation, (B) deformation of the shell only, (C) deformation of the core only. The symbols are the experimental intensities obtained at "native" concentration (25 g/L, *open circles*) and after extreme osmotic compression (400 g/L, *open squares*). The red line is the best fit before compression (Table S1). The blue and purple lines are the intensities calculated at different degrees of compression (Table S2). The dotted lines help in locating the intensity shifts induced by the compression.

The estimated parameters are listed in Table S2 for each scenario. The calculated intensities are presented in Fig. S3 A, B and C. In the two first cases, the compression induces both an increase in magnitude and a shift in the q -position of the first and intermediate peaks of the SAXS curve (Fig. S3 A and B). In the third case, the compression makes the core-shell structure more uniform in density so that the intermediate peak becomes less visible (Fig. S3 C).

Clearly, none of these variations matches those obtained experimentally (= loss of relative intensity of the two first peaks and constant q -position of the intermediate peak). Moreover, it is unlikely that particle interactions, which are ignored in our calculations, are responsible for this mismatch, even if such interactions are potentially strong in a context of concentrated dispersions of core-shell particles. Accordingly, it seems quite difficult to conciliate the *core-shell* model recently proposed by Shukla *et al.* (4) and the SAXS data we obtained from compressed casein micelle dispersions.

S1-3 Presence of *mini-micelles*

Calculated SAXS intensities with two coexisting populations of casein micelles

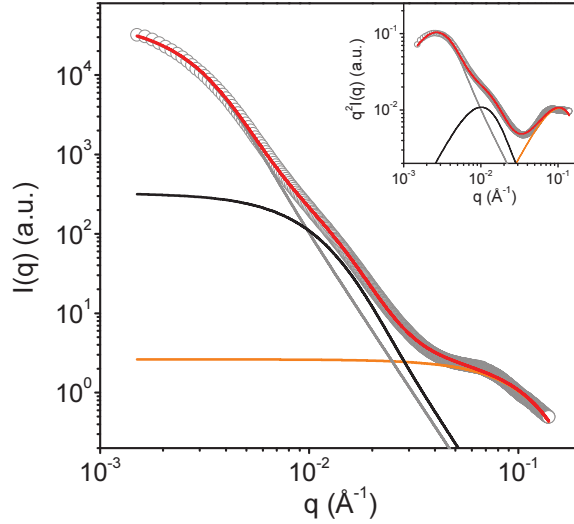


FIGURE S4 The SAXS intensities of a 25 g/L casein micelle dispersion (open circles) together with the best fit of the form-factor model of Gebhardt *et al.* (red line) (6–8). The contributions of each structural element n to the global fit are displayed as well: casein micelles ($n = 0$, gray line), hypothetical *mini-micelles* ($n = 1$, black line) and CaP nanoclusters ($n = 2$, orange line).

Fig. S4 shows the SAXS data we obtained from a dispersion at "native" concentration, i.e., at 25 g/L. The red line represents the intensities calculated from a form-factor model that is identical to the one used by Gebhardt *et al.* in GISAXS studies of dry thin films of casein micelles (6–8). In this model, intensity $I(q)$ is the sum of the intensities scattered by the casein micelles (level 0) together with a separate population of small micelles called *mini-micelles* (level 1) and the CaP nanoclusters (level 2). The effects of interactions between the objects are not taken into account so that the intensity is given by:

$$I(q) = c \left[\phi_0 v_0 (\Delta\rho_0)^2 P_0(q) + \phi_1 v_1 (\Delta\rho_1)^2 P_1(q) + \phi_2 v_2 (\Delta\rho_2)^2 P_2(q) \right] \quad (\text{S8})$$

where c is a constant accounting for the total concentration in caseins. ϕ_n is the volume fraction occupied by the structural element n in the dispersion, while v_n and $\Delta\rho_n$ are its volume and average scattering contrast, respectively. $P_n(q)$ are the form factors of each object.

In our calculations, we assumed that $P_n(q)$ are the form factors of polydisperse hard spheres that follow a Schulz size distribution with a number average diameter d_n and polydispersity σ_n . We used the expressions of Aragon *et al.* to estimate those form factors (9). The d_n and σ_n values we obtained from an adequate fit to our data at 25 g/L are given in Table S3. The average size we

obtained for the putative *mini-micelles* population is quite similar (despite a little bit higher) to the one calculated by Gebhardt *et al.* with thin films of casein micelles (6–8).

TABLE S3 Parameters obtained from the best fit of the "form factor model" to the casein micelle SAXS profile at $C = 25$ g/L.

Structural level	d_n (nm)	σ_n
$n = 0$, casein micelles	73.1	0.50
$n = 1$, hypothetical <i>mini-micelles</i>	20.9	0.45
$n = 2$, CaP nanoclusters	3.4	0.20

Such a fit of Eq. S8 to our data makes possible to estimate the relative importance of the hypothetical *mini-micelles* population compared to the population of "regular" casein micelles. To reproduce the hump observed at intermediate q values, it is indeed necessary to set a ratio

$$\frac{\phi_0 v_0 (\Delta\rho_0)^2}{\phi_1 v_1 (\Delta\rho_1)^2} \approx 150. \text{ Knowing the average dimensions of the casein micelles and the } mini\text{-micelles}$$

(Table S3) and assuming that the scattering contrast of the *mini-micelles* is equal or inferior to the micelles contrast ($\Delta\rho_0 \geq \Delta\rho_1$), we found $\phi_1/\phi_0 \geq 0.28$. Converted into a number ratio, this suggests that *mini-micelles* would be 12 times more numerous than "regular" casein micelles. However, the latest electron microscopy images obtained with casein micelle dispersions (either made from "fresh" skimmed milk or NPC powder) do not show any evidence of such a large population of *mini-micelles* (10–12).

Dynamic light scattering

To gain further information about the hypothetical presence of *mini-micelles* in our dispersions, we performed a series of dynamic light scattering (DLS) experiments. The *mini-micelles* hypothesis indeed originates from DLS measurements made by Muller-Buschbaum *et al.* with dispersions at $C \leq 30$ g/L (13). The DLS data we obtained in the same experimental conditions and with a very similar apparatus are given in Fig. S5, *A* and *B*. Clearly, DLS was not able to detect any objects with diameters < 50 nm in our case and a single population of "regular" casein micelles was sufficient to accurately describe the measured intensity correlation function.

Additionally, we performed measurements with DLS instruments of various optical configurations (Fig. S6). In particular, we used an instrument that combines DLS in the backscattering mode with thin layer measurements and that is, in theory, more able to measure "difficult" size distributions (VASCO Particle Size Analyzer, Cordouan Technologies, Pessac, FR). Again, none of these results indicated the presence of small objects with diameters < 50 nm.

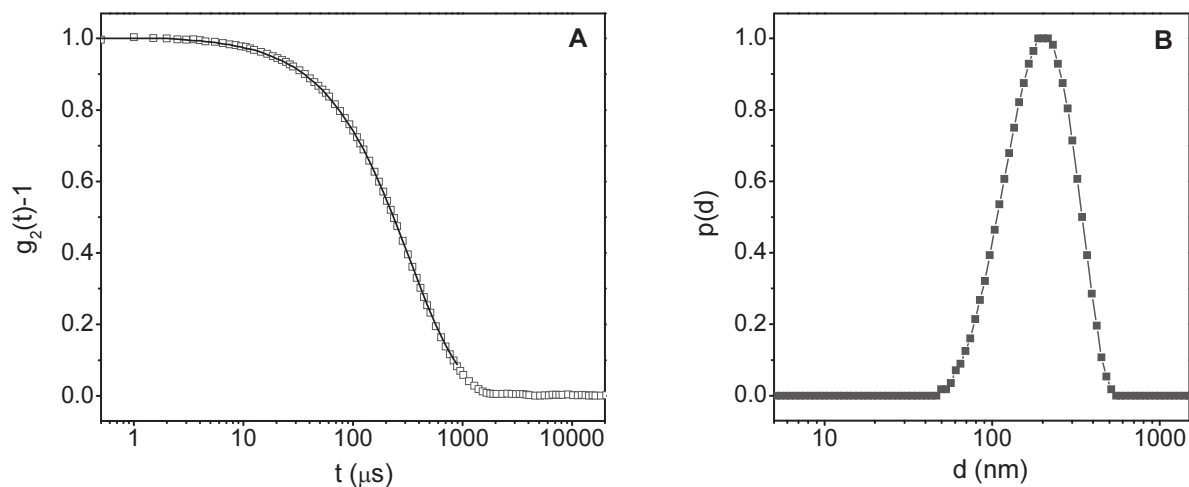


FIGURE S5 (A) DLS intensity correlation function $g_2(t)-1$ of a casein micelle dispersion made from NPC+UF at 2.5 g/L casein concentration (*open squares*). The solid line shows the fit calculated with the size distribution of Fig. S5 B. The measurement was performed in backscattering mode at angle 173° and temperature 20°C with a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK). (B) The calculated intensity size distribution function $p(d)$ as a function of casein micelle diameter d .

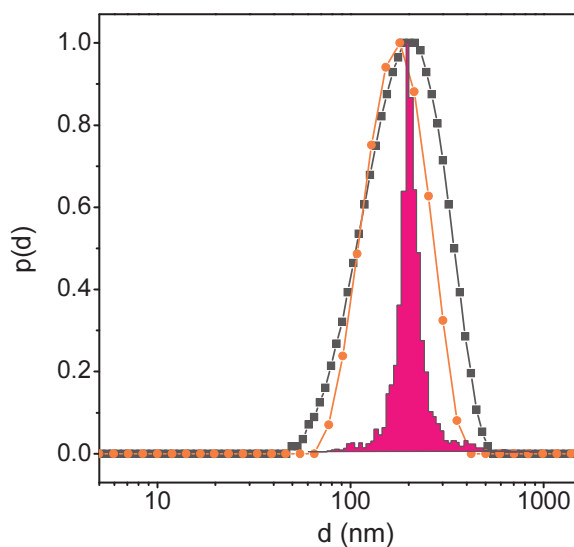


FIGURE S6 The intensity size distribution function $p(d)$ of casein micelle dispersions made from NPC+UF: casein concentration $C = 0.25$ g/L, Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Malvern, UK), angle 90° , CONTIN algorithm (*black squares*); $C = 2.5$ g/L, Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK), backscattering mode at angle 173° , CONTIN algorithm (*orange circles*); $C = 25$ g/L, thin layer measurement, VASCO Particle Size Analyzer (Cordouan Technologies, Pessac, FR), backscattering mode at angle 135° , multi-acquisition and Padé-Laplace algorithm (*pink-filled area*). All measurements were performed at 20°C .

As it was still possible that the presence of the "regular" casein micelles makes the signal of *mini-micelles* hardly detectable, we performed other DLS experiments with dispersions in which casein micelles were partially removed by ultracentrifugation (Fig. S7). Ultracentrifugation was done at $70\,000 \times g$ and 20°C with a Sorvall Discovery 90 SE ultracentrifuge (Hitachi, USA) and the casein concentration in the supernatants was determined using the Bradford method (14). The total amount of casein removed was $\sim 78\%$ after 30 min centrifugation. According to our previous estimation of the volume fraction occupied ϕ_1 by the hypothetical *mini-micelles* ($\phi_1/\phi_0 \geq 0.28$), such a percentage is theoretically sufficient to make the *mini-micelles* population visible in DLS. Fig. S7 shows that this partial elimination of casein led to a global shift of the micelles intensity size distribution towards lower sizes, which was expected. On the other hand, DLS was not able to detect a distinct population of objects at the sizes expected for the *mini-micelles*, i.e. between 10 and 50 nm.

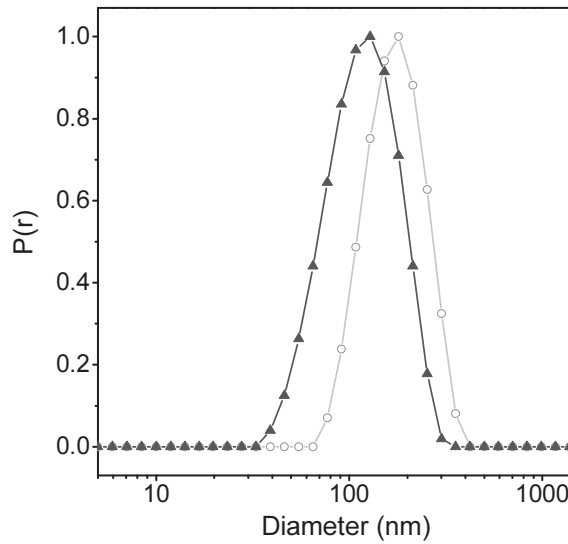


FIGURE S7 The intensity size distribution function $p(d)$ of a casein micelle dispersion made from NPC+UF at $C = 0.25$ g/L (*empty circles*) and of supernatants obtained after 30 min ultracentrifugation at $70\,000$ g of a 25 g/L dispersion made from NPC+UF (*black triangles and green diamonds*). After ultracentrifugation, $\sim 78\%$ of the caseins were removed. All measurements were performed at 20°C .

As a conclusion of this note, we think it is quite reasonable to assume that *mini-micelles* are not present in our dispersions, or, at least, are not enough numerous to contribute to the SAXS profiles we present in the article.

Note S2: Sponge model

Quality of the fits and parameters obtained

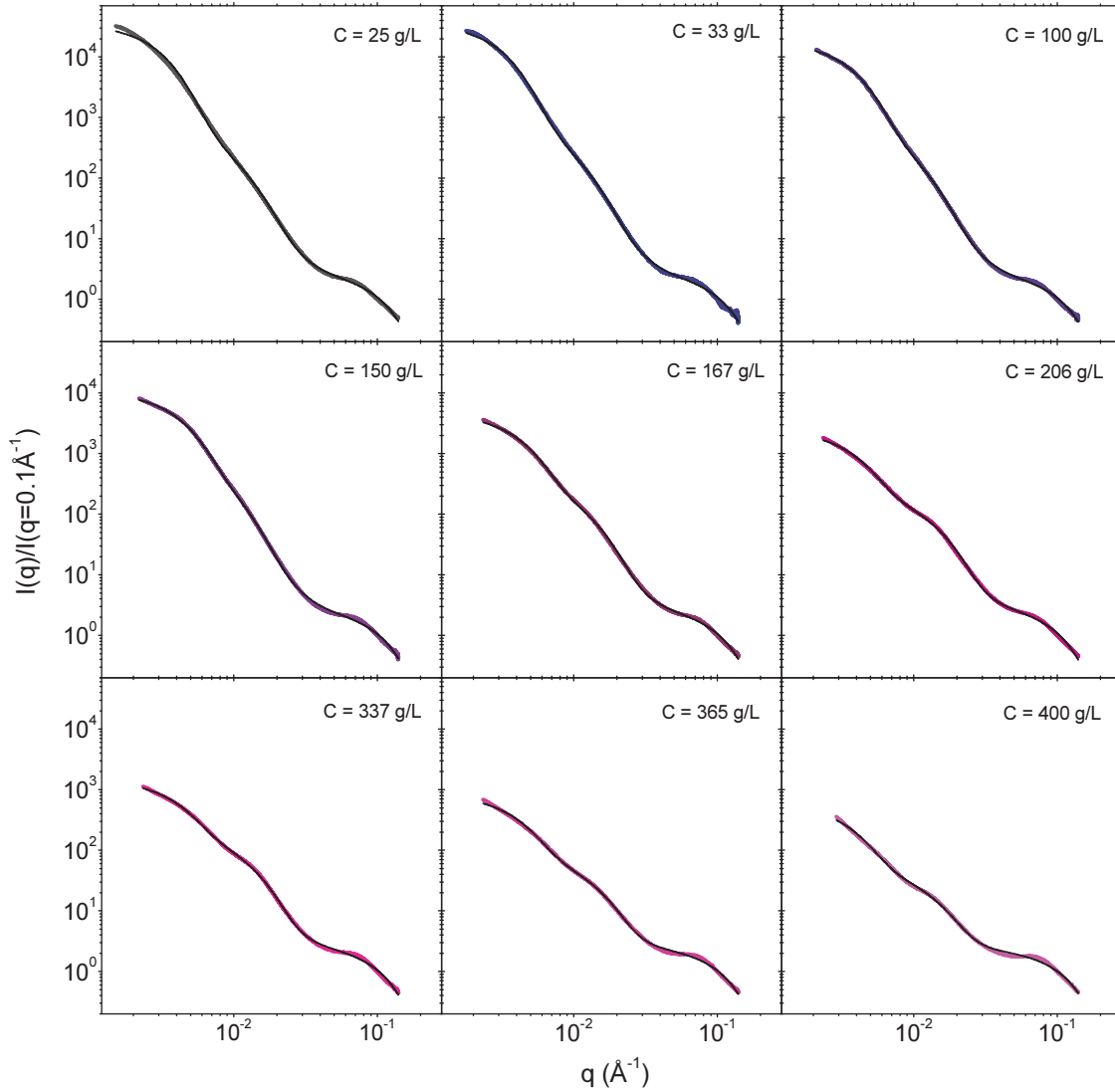


FIGURE S8 Modeling of the SAXS intensities of compressed casein micelle dispersions. The thick colored lines are the experimental data. The thin black lines show the best fits to the model.

In our article, we propose to describe our SAXS data with a cell model having 3 distinct levels of structure: the micelle (level 0), some "hard" regions within the micelle (level 1), and the CaP nanoclusters (level 3) (see text and Eqs. 2 to 5). Fig. S8 above is an alternative view of the fits of the data to this model. The agreement is excellent in all cases.

In the calculations of $I(q)$ with Eq. 2, we assumed that $P_n(q)$ are the form factors of polydisperse hard spheres that follow a Schulz size distribution with a number average diameter d_n and

polydispersity σ_n and we used the expressions of Aragon *et al.* to estimate those form factors (9). Additionally, in order to minimize the number of free parameters in the model, we set the σ_n values to realistic ones, i.e. $\sigma_n = 1/3$ for the micelles ($n = 0$) and the "hard" regions ($n = 1$) and $\sigma_2 = 0.2$ (CaP nanoclusters). So only the pre-factors a , b and c , and the diameters d_n were varied to fit the data at each concentration. The parameters obtained from the fits are listed in Table S4. Fig. S9 gives the size distributions that correspond to the three structural levels of the model for $C = 25$ g/L.

TABLE S4 Parameters obtained from the fits of the model to the experimental data.

	Level 0 - Micelle			Level 1 - "Hard" regions			level 2 - CaP nanoclusters		
C (g/L)	a	d_0 (nm)	σ_0	b	d_1 (nm)	σ_1	c	d_2 (nm)	σ_2
25	34678.8	92.0	0.33	251.3	24.6	0.33	2.6	3.4	0.20
33	35405.0	89.0	0.33	322.6	25.6	0.33	2.7	3.4	0.20
100	17499.4	76.1	0.33	299.6	25.9	0.33	2.6	3.4	0.20
150	9998.6	67.0	0.33	396.8	28.6	0.33	2.6	3.4	0.20
167	4323.5	66.1	0.33	219.2	21.9	0.33	2.7	3.5	0.20
206	2258.5	72.4	0.33	172.2	20.1	0.33	3.0	3.6	0.20
337	1317.1	68.8	0.33	148.9	21.9	0.33	2.6	3.4	0.20
365	765.1	68.8	0.33	64.9	20.3	0.33	2.5	3.3	0.20
400	558.3	77.0	0.33	39.8	20.8	0.33	2.3	3.2	0.20

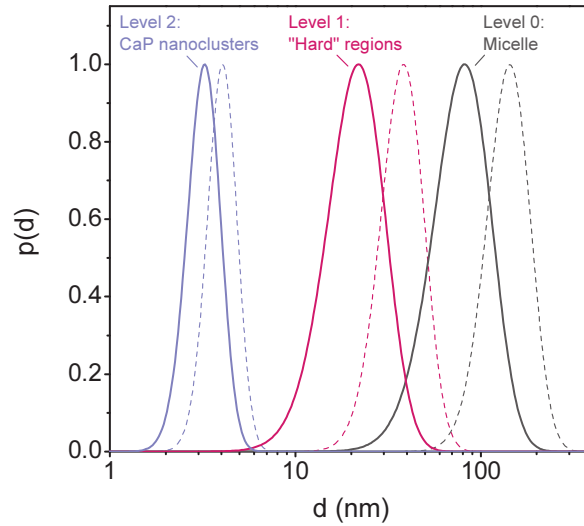


FIGURE S9 The size distribution functions $p(d)$ obtained from the best fits of our model to the SAXS data at $C = 25$ g/L. In our calculations, we implicitly assumed that the pseudo-form factors $P_0(q)$, $P_1(q)$ and $P_2(q)$ in Eq. 2 are form factors for polydisperse hard spheres. The solid lines are the number size distributions that were directly used for the calculation of the pseudo-form factors through the expressions of Aragon *et al.* (9). The dashed lines are the corresponding "intensity" size distributions assuming $I \propto d^6$. For the casein micelle (level 0), this distribution matches that measured through dynamic light scattering (see Fig. S5 B or ref (15)).

Calculation of ϕ_0 , ϕ_1 and ϕ_2 as a function of casein concentration

Knowing, the values of the prefactors a , b and c , it is possible to estimate the volume fractions ϕ_0 , ϕ_1 and ϕ_2 that appear in the model. For that purpose, we use the following expressions, deduced from Eqs. 3-5:

$$\phi_1 = 1 - \left[\frac{b (\Delta\rho_2)^2}{c (\Delta\rho_1)^2} \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^3 \phi_2 (1 - \phi_2) \right] \quad (\text{S9})$$

$$\phi_0 = 1 - \left[\frac{a (\Delta\rho_1)^2}{b (\Delta\rho_0)^2} \left(\frac{d_1}{d_0} \right)^3 \phi_1 (1 - \phi_1) \right] \quad (\text{S10})$$

For simplicity, we also make the following hypothesis:

- . The "hard" regions are not compressed in the concentration range investigated, which seems very reasonable since the characteristic dimension D_1^* does not change during compression. This implies that ρ_1 , $\Delta\rho_2$, and ϕ_2 do not change with concentration.

- . The average scattering of the micelle, $\Delta\rho_0$, does not change with concentration. This hypothesis is questionable since we know the micelle is compressed and loses solvent at high compression. However, we have no rationale to estimate the increase in $\Delta\rho_0$ that would result from the compression (When does the compression start? What is the balance between deformation and deswelling? ;...). Moreover, we found that such an increase, even if exaggerated, does not induce any significant changes in the general variation of ϕ_n with C (results not shown).

- . The "hard" regions contain all the CaP and protein materials and are separated by voids filled with solvent. This gives the following relation between $\Delta\rho_0$ and $\Delta\rho_1$ for the uncompressed micelle:

$$\Delta\rho_1 = \Delta\rho_0 \left(\frac{1 - \phi_1}{\phi_1} \right) \quad (\text{S11})$$

- . The CaP nanoclusters occupy ~1% of the micelle volume (2), leading to this other simple relation for the uncompressed micelle :

$$(\phi_1 \phi_2) \approx 0.01 \quad (\text{S12})$$

Table S5 gives the electron densities we estimate for the solvent (ρ_{UF}), the overall micelle (ρ_0) and the CaP nanoclusters (ρ_2), using relevant references. The calculation then first consists in setting ϕ_2 at an initial value close to 0.01 and estimating the contrast parameters $\Delta\rho_1$ from Eqs. S12 and S11, and $\Delta\rho_2$ from $\Delta\rho_2 = \rho_2 - \rho_1$. Knowing all the contrast parameters, Eqs. S9 and S10 were then used to calculate ϕ_0 and ϕ_1 for all concentrations using the data of Table S5. If the volume fractions ϕ_1 calculated for the lowest concentrations were too different from $0.01/\phi_2$ (Eq. S12), ϕ_2 was increased by a small increment and the calculation repeated. This procedure was continued until the condition (S12) was satisfied at low concentration, i.e., when the micelle is not compressed. A final value of 0.02 was found for ϕ_2 . The corresponding contrast parameters are given in Table S5 and the resulting values of ϕ_0 and ϕ_1 are given in Fig. 5 A of the article.

Fig. S10 gives the electron density of each structural level relative to the electron density of the solvent.

TABLE S5 Parameters used for the calculation of ϕ_0 and ϕ_1 from the fits of the hierarchical model to the SAXS patterns of compressed casein micelle dispersions.

Parameter	Value	Calculation method and/or reference(s)
ρ_{UF} (solvent electron density)	350 e ⁻ /nm ³	. water electron density $\rho_w = 334$ e ⁻ /nm ³ . ion composition of ref. (16) . lactose concentration ~46 g/L
ρ_2 (nanoclusters electron density)	539 e ⁻ /nm ³	. an average nanocluster of diameter 4.8 nm contains 355 CaHPO ₄ ·2H ₂ O units, ref. (17)
ρ_0 (micelle electron density)	365 e ⁻ /nm ³	. micelle voluminosity = 4.4 mL/g, ref. (15) . casein e ⁻ density = 3.16×10^{23} e ⁻ /g, ref. (18) . casein specific volume = 0.736 mL/g, ref. (18) . 7 g of CaP per 100 g of dry casein, refs. (2,19)
ρ_1 (electron density of the "hard" regions within the micelle)	381 e ⁻ /nm ³	. Eqs. S11 and S12
$\Delta\rho_0 = \rho_0 - \rho_{UF}$	15 e ⁻ /nm ³	-
$\Delta\rho_1 = \rho_1 - \rho_0$	16 e ⁻ /nm ³	-
$\Delta\rho_2 = \rho_2 - \rho_1$	158 e ⁻ /nm ³	-
ϕ_2	0.02	-

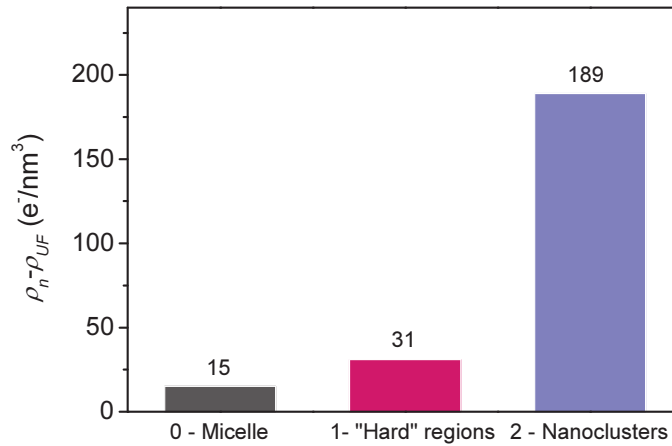
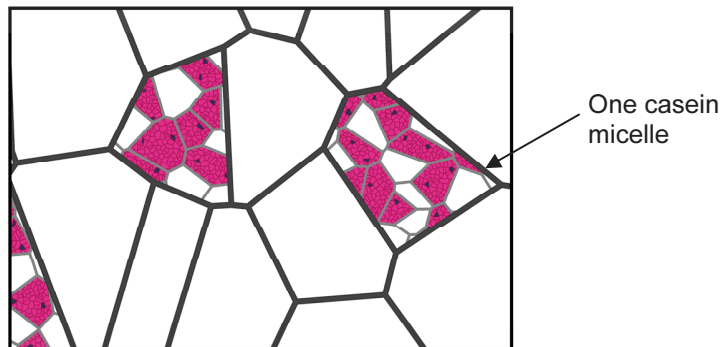
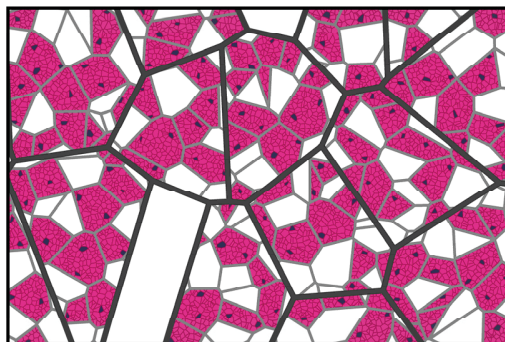


FIGURE S10 The estimated electron density of the three structural levels $n = 0$ (micelle), 1 (the "hard" regions) and 2 (CaP nanoclusters), relative to the electron density of the solvent ($\rho_{UF} = 350$ e⁻/nm³).

A - Dilute regime



B - Close-packing



C - Compressed x2

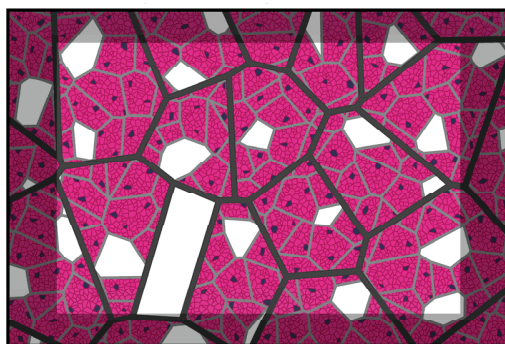


FIGURE S11 The different consecutive states of the casein micelle during compression according to the *sponge model* (highly schematic). Following our description of the model, the dispersion is decomposed into Voronoi cells that either contain casein micelles (see Fig. 6 of the article) or solvent (blank cells) (*A*) Dilute regime: the micelles are still separated from each other. Half of their internal structure is made of voids filled with solvent ($\phi_1 \approx 0.5$) (*B*) Close-packing: in their great majority, the micelles are in direct contact ($\phi_0 \approx 1$) but their internal structure is not yet affected ($\phi_1 \approx 0.5$). (*C*) Compressed x2: the micelles are compressed such that their volume is twice lower than in the initial state. The "hard" regions have been pushed closer together so that the majority of the voids that composed the internal structure have collapsed ($\phi_1 \approx 0.5$).

References

1. Mattsson, J., H. M. Wyss, A. Fernandez-Nieves, K. Miyazaki, Z. Hu, D. R. Reichman, and D. A. Weitz. 2009. Soft colloids make strong glasses. *Nature*. 462:83-86.
2. Holt, C., C. G. De Kruif, R. Tuinier, and P. A. Timmins. 2003. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids Surf. , A*. 213:275-284.
3. Marchin, S., J. L. Putaux, F. Pignon, and J. Léonil. 2007. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering/ultras-small-angle X-ray scattering. *J. Chem. Phys.* 126:045101-045110.
4. Shukla, A., T. Narayanan, and D. Zanchi. 2009. Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter*. 5:2884-2888.
5. Kohlbrecher, J. and I. Bressler. SASfit version 0.92.3. <http://kur.web.psi.ch/sans1/SANSSoft/sasfit.html>. Accessed June 9, 2010.
6. Gebhardt, R., M. Burghammer, C. Riekkel, S. Volkher Roth, and P. Müller-Buschbaum. 2008. Structural changes of casein micelles in a calcium gradient film. *Macromol. Biosci.* 8:347-354.
7. Gebhardt, R., M. Burghammer, C. Riekkel, U. Kulozik, and P. Müller-Buschbaum. 2010. Investigation of surface modification of casein films by rennin enzyme action using micro-beam grazing incidence small angle X-ray scattering. *Dairy Sci. Technol.* 90:75-86.
8. Gebhardt, R., S. V. Roth, M. Burghammer, C. Riekkel, A. Tolkach, U. Kulozik, and P. Müller-Buschbaum. 2010. Structural changes of casein micelles in a rennin gradient film with simultaneous consideration of the film morphology. *Int. Dairy J.* 20:203-211.
9. Aragon, S. R. and R. Pecora. 1976. Theory of dynamic light scattering from polydisperse systems. *J. Chem. Phys.* 64:2395-2404.
10. McMahon, D. J., H. Du, W. R. McManus, and K. M. Larsen. 2009. Microstructural changes in casein supramolecules during acidification of skim milk. *J. Dairy Sci.* 92:5854-5867.
11. Knudsen, J. C. and L. H. Skibsted. 2010. High pressure effects on the structure of casein micelles in milk as studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chemistry*. 119:202-208.
12. Martin, A. H., H. D. Goff, A. Smith, and D. G. Dalgleish. 2006. Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). *Food Hydrocolloids*. 20:817-824.
13. Müller-Buschbaum, P., R. Gebhardt, S. V. Roth, E. Metwalli, and W. Doster. 2007. Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophys. J.* 93:960-968.
14. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bonding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

15. De Kruif, C. G. 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.* 81:3019-3028.
16. Jenness, R. and J. Koops. 1962. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.* 16:153-164.
17. Holt, C., P. A. Timmins, N. Errington, and J. Leaver. 1998. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by beta-casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron-scattering measurements. *Eur. J. Biochem.* 252:73-78.
18. Farrell, H. M., Jr., H. Pessen, E. M. Brown, and T. F. Kumosinski. 1990. Structural insights into the bovine casein micelle: small angle X-ray scattering studies and correlations with spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 73:3592-3601.
19. Walstra, P., A. T. J. M. Woutersen, and T. J. Geurts. 2006. Dairy Science and Technology. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL.

Annexe C-3

Ouanezar et al., Langmuir, 2012

AFM Imaging of Milk Casein Micelles: Evidence for Structural Rearrangement upon Acidification

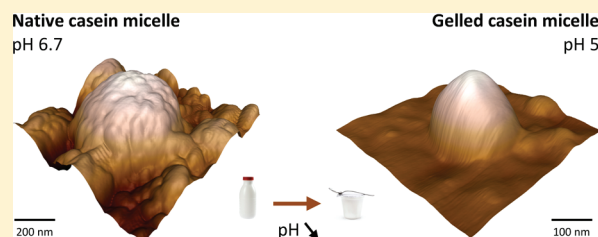
Mustapha Ouanezar,^{†,‡} Fanny Guyomarc'h,^{*,†,‡} and Antoine Bouchoux^{*,†,‡,§}

[†]INRA, UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

[‡]AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Milk casein micelles are natural association colloids that we all encounter in everyday life, yet we still lack an accurate description of their internal structure and the interactions that stabilize it. In this letter, we provide for the first time detailed images of intact casein micelles as obtained through atomic force microscopy under liquid conditions close to physiological. The micelles appear as heterogeneous raspberry-like particles, which is consistent with a hierarchical/spongelike structure made of connected 10–40 nm dense casein regions. Upon in situ acidification to pH 5, the micelles decrease in size and lose their surface heterogeneities, indicating that this structure is highly sensitive to variations in mineral content and caseins net charge.



I. INTRODUCTION

The casein micelles of bovine milk are an essential vector of nutrients for the neonate as well as the building blocks of most dairy gels (i.e., yogurts and cheeses). Elucidations of the nanostructure of this particle and of the interaction forces that account for its stability are fundamental to understanding its physiological function and dynamics in dairy processes.^{1–4} These questions have been investigated extensively for more than 50 years now but remain topical issues,^{5–10} essentially because of the difficulty in retaining the native structure of the casein micelle during experimental observations, as in electron microscopy for instance.^{11–13} This letter aims at making a brief but substantial contribution to the field through the direct AFM observation of single casein micelles in various environments.

Casein micelles are roughly spherical, hydrated colloids with a 40% polydisperse size distribution and an average diameter of 100–200 nm.^{14,15} They result from the supramolecular assembly of casein proteins and mineral nanoclusters of calcium and phosphate (CaP). Various pioneering models have been initially proposed for the internal structure of the casein micelle, namely, the submicelle model,³ the homogeneous network model,¹⁵ and the dual-binding model.¹⁶ With respect to recent results from light, neutrons, and/or X-ray scattering experiments,^{7,8,17–20} current models all consider the micelle to be a matrix of proteins in which the nanoclusters act as connecting or seeding points for casein assembly. They differ from each other in the way that the CaP nanoclusters are distributed in the matrix^{7,8,18,19} and/or in whether the matrix itself is homogeneous²⁰ or spongelike.^{6,17}

At this stage, one clearly needs new and complementary experimental information to elucidate the casein micelle structure fully. In contrast to reciprocal-space scattering techniques that yield ensemble-averaged dimensions, real-

space microscopy techniques can uncover decisive and direct structural information. In that respect, atomic force microscopy (AFM) in liquid appears to be a great opportunity to image the casein micelle in its native environment, with no preparation other than immobilization onto a flat surface. However, reported attempts show limited resolution^{21–25} and can be challenged with recent, more powerful equipment. Furthermore, AFM can accommodate in situ changes in the aqueous phase so that the technique holds unique potential for the direct observation of structural modifications of single casein micelles in reaction to stress such as acidification.

In this letter, we provide for the first time detailed images of the casein micelle in its natural environment. These images clearly show that the surface of the micelle is heterogeneous; a feature that is supportive of a spongelike micellar structure made from the assembly of 10–40 nm dense casein regions that contain the CaP nanoclusters.¹⁷ In the second part, we provide images of single casein micelles at pH 5. The results indicate that the micelles shrink and lose their surface heterogeneity upon acidification, thus forming small, smooth casein particles. This suggests that casein micelles can retain a particulate structure at the pH value in which milk normally forms a gel and supports the view of acid milk gels as connected chains of compacted micelles.

II. EXPERIMENTAL METHODS

Skim milk depleted in serum proteins was prepared by the dispersion of micellar casein powder in skim milk ultrafiltration permeate. Such a powder is obtained through spray drying after having isolated the

Received: January 10, 2012

Revised: March 1, 2012

Published: March 4, 2012



casein micelles of raw skim milk using microfiltration under conditions that are meant to maintain their native physicochemical properties.^{26–28} Total solids include $\sim 815 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of caseins, $\sim 85 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of their associated minerals (included CaP), $\sim 65 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of residual whey proteins and other small peptides, and $\sim 10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of lactose. All dispersions were prepared at 50 g/L caseins and stirred overnight at 35°C to ensure the full dissociation of the powder and complete equilibration.²⁹ They were then dialyzed (SpectraPor Biotech membrane, Spectrum Europe, Breda, Netherlands) against “synthetic” milk ultrafiltrate (SMUF), a lactose-free saline solution that has the same mineral balance and the same pH as milk.³⁰ This dialysis step is meant to remove further residual noncasein nitrogen (e.g., peptides, urea, etc.), thus preventing competition during the immobilization reaction and background noise on the images. SMUF was prepared by sequentially adding $1.58 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, $1.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}_3\text{citrate}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $1.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{Na}_3\text{citrate}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}_2\text{SO}_4$, $1.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}_2\text{CO}_3$, and $0.60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{KCl}$ to ultrapure water. It was then adjusted to pH 6.7 or 5.0, filtered through a $0.1 \mu\text{m}$ membrane, and used within 48 h.

The casein micelles were immobilized onto gold-sputtered glass surfaces (Platypus Technologies LLC, Madison, WI, USA) that were precoated with carboxyl groups, activated by carbodiimide chemistry,^{12,22} and then rinsed to eliminate reactants prior to immersion into the dialyzed casein dispersion. Prior to AFM imaging, the samples were rinsed with SMUF at pH 6.7 and then equilibrated at room temperature in SMUF at pH 6.7 or 5.0 or placed in a desiccator until dry.

Imaging of the immobilized casein micelles was performed using an MFP3D-BIO AFM (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) operated in AC mode and at room temperature. Images in liquid were obtained using TR400PSA silicon nitride probes (Olympus, Tokyo, Japan; nominal spring constant $\sim 0.02 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, nominal tip radius of curvature $\sim 20 \text{ nm}$) with applied forces of $0.5\text{--}2 \text{ nN}$.³¹ Images in air were obtained using AC240TS silicon probes (Olympus, spring constant $\sim 2 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, radius of curvature $\sim 9 \text{ nm}$) with applied forces of $30\text{--}50 \text{ nN}$. The height and width of individual casein micelles were measured using a particle analysis tool implemented in the AFM software. The sizes of ~ 200 individuals from ~ 8 images were computed to build the density maps in Figure 2.

As always in AFM imaging, it is imaginable that tip-sample convolution effects are present in the AFM images reported here, making the prominent features appear to be a few nanometers wider and smoother than they are in reality. Those effects are not discussed further in this work because it is impossible to evaluate them precisely.

III. RESULTS AND DISCUSSION

III.1. Casein Micelles under Native Ionic Conditions.

Figure 1 shows AFM height images of the immobilized casein micelles in simulated milk ultrafiltrate. Individual micelles of $\sim 75\text{--}400 \text{ nm}$ can be easily distinguished from the gold surface with its typical nanometric roughness. The obtained surface coverage is $\sim 5 \text{ micelles}/\mu\text{m}^2$. Despite reported limitations,²²

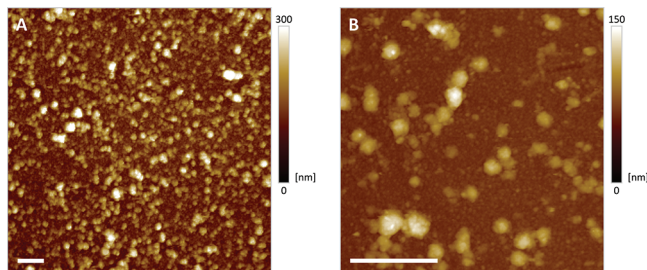


Figure 1. AFM height images illustrating the successful immobilization of casein micelles onto gold. Images were taken in liquid (SMUF) at pH 6.7. The white scale bar is $1 \mu\text{m}$.

those images demonstrate that carbodiimide chemistry is successful in immobilizing casein micelles near neutral pH.

As expected, particle analysis shows that the micelles are polydisperse with height and width distributions that are consistent with the diameters measured before immobilization using dynamic light scattering (DLS; see SI, part I, Figures S1A and S1B). Figure 2 combines the height and width distributions

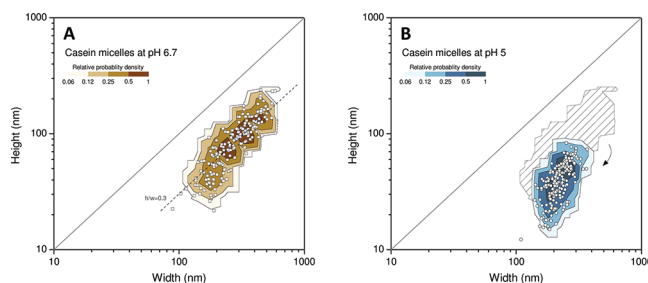


Figure 2. Size properties of casein micelles as seen through AFM. (A, B) Height (h) vs width (w) plots for individual micelles under close-to-native (pH 6.7) and acidic conditions (pH 5), respectively. Both images contain indicative contour plots that give the relative probability of finding a micelle with given specific dimensions. The solid line corresponds to the ideal case of nondeformable spherical objects with $h/w = 1$. The dashed line in A represents $h/w = 0.3$. To highlight the effect of acidification, the limiting contour of the density map obtained at pH 6.7 is shown in B as a dashed area.

at various pH values into more informative 2D size density maps. Figure 2A clearly shows that all of the immobilized micelles at pH 6.7 are larger than they are high, with a mean width (w) of $\sim 300 \text{ nm}$ and a height (h) of $\sim 100 \text{ nm}$.

As previously reported when casein micelles are physisorbed on graphite,²³ this indicates that the micelles deform on immobilization and adopt the shape of a spherical cap. The aspect ratio of this cap is about the same for all of the micelles, with $h/w \approx 0.3$, meaning that the micelles all experience the same degree of deformation. If we define the average micelle as the micelle with the highest probability of being in the dispersion, then we can estimate its volume V through $V = ((\pi h)/6)(3(w/2)^2 + h^2)$ and using the mean values of w and h specified above. This gives $V \approx 4 \times 10^6 \text{ nm}^3$, a volume that is very close to that of a sphere of diameter 175 nm ($V \approx 2.8 \times 10^6 \text{ nm}^3$), the average DLS size of the micelle as measured before immobilization (SI, part I). This implies that the micelles deform without losing volume on immobilization. This, plus the fact that the micelles do not appear to fragment during sample preparation (as can occur under other conditions¹¹), suggests that the presented AFM images are representative of “native” micelles. These results open exciting perspectives for the application of force spectroscopy to the investigation of colloidal interactions between casein micelles or other dynamic protein assemblies. This will be the purpose of future studies.

Let us now focus on the decisive insight of AFM on the topography of casein micelles. For the first time indeed, the detailed features of single casein micelles are visualized under hydrated, close-to-native conditions using high-resolution AFM imaging in liquid. Figure 3A,B clearly shows that the surface of the hydrated micelle is rough, with the appearance of a raspberry. Similar surface heterogeneities were recently reported by Dagleish et al. with dehydrated micelles imaged through field-emission scanning electron microscopy (FE-

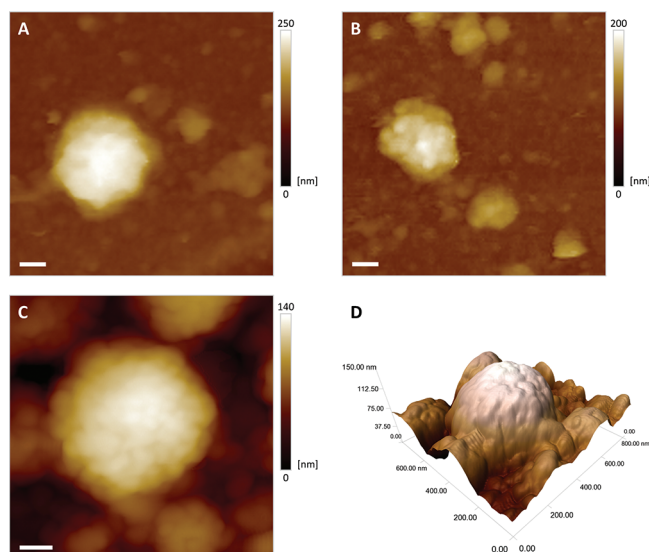


Figure 3. Close views of casein micelles in a close-to-native state. (A, B) are AFM height images taken in fluid (SMUF) at pH 6.7. (C) Image of the same type of sample but taken in air after a thorough rinsing with SMUF and drying. (D) Three-dimensional rendering of image C. The white scale bar is 100 nm.

SEM).¹¹ However, it was still unclear whether these heterogeneities were the result of the dehydration process or were a specific feature of casein micelles.

The size of these surface heterogeneities, as measured on the AFM images in liquid, is typically found to be between 30 and 50 nm (SI, part III, Figure S3A). This length is in fair agreement with an internal characteristic distance that was found in the latest SAXS experiments,^{7,8} including our own work.¹⁷ This suggests that the heterogeneity of the casein micelle surface as imaged by the AFM somewhat reflects an equally heterogeneous internal structure. Beginning with the now invalidated submicelle model,^{3,32} various models of the casein micelle structure have been proposed to account for spatial variations in mass density within the micelle.^{6–8,13,17,33} Some of these models, which are based on advanced electron microscopy images, propose that channels or pores run through a continuous casein–CaP matrix.^{6,13,33} On the other hand, the spongelike model describes the casein micelle as the hierarchical assembly of 10–40 nm casein regions that contain the nanoclusters and are connected to each other.¹⁷ On the supramolecular scale, this last model implies that the periphery of the casein micelle is in fact the continuum of its internal structure. Then the sponge model appears to be a good candidate for explaining the presence and dimensions of the surface irregularities revealed by our AFM images.

Interestingly, images obtained in air on desiccated casein micelles are very comparable to those obtained in liquid (Figure 3C,D; SI, part II). On these images, the heterogeneous aspect of the micelle is even more visible, probably because of the collapse of the internal voids on dehydration but also because AFM high-resolution imaging is much easier to achieve in air.

III.2. Changes in Casein Micelle Structure upon Acidification. A major opportunity of the AFM technique is the possibility to image objects in liquids, without cross-linking their structure and/or coating their surface. Thus, it is possible to exchange the liquid medium and to observe the structural changes of the immobilized object in reaction to the environmental stress. The approach is particularly exciting for

dynamic objects such as the casein micelle, whose structure under conditions other than those of fresh, untreated milk is virtually unknown.

We used this methodology to monitor the change in casein micelle structure upon acidification, which occurs during yogurt making, for instance. Casein micelles at pH 6.7 were therefore immobilized at that pH and then immersed and imaged in SMUF at pH 5.0 (Figure 4A,B) or in air (Figure 4C,D).

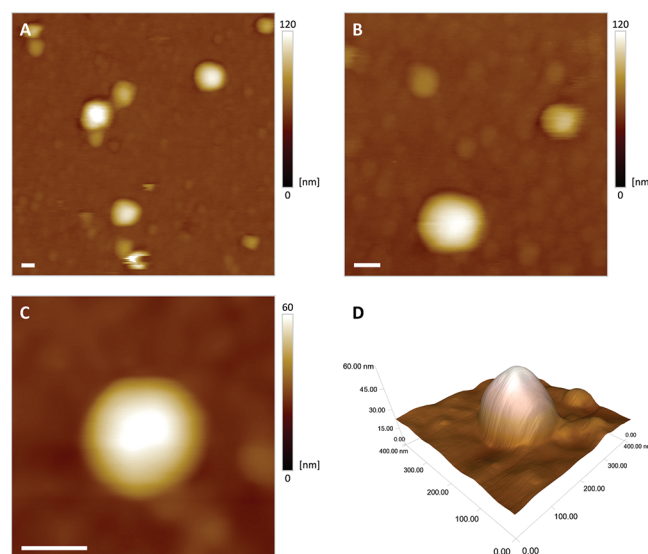


Figure 4. Close views of casein micelles under acidic conditions. (A, B) AFM height images taken in fluid (SMUF) at pH 5. (C) Image of the same type of sample but taken in air after a thorough rinsing with SMUF and drying. (D) Three-dimensional rendering of image C. The white scale bar is 100 nm.

Because of the time needed to equilibrate the AFM probe in liquid, the casein micelles at pH 5 were assumed to have reached their equilibrium state at the time of imaging. Also their size and shape did not change between successive images.

All the images obtained show casein micelles with a smooth surface, suggesting that the heterogeneous features observed at pH 6.7 have disappeared (SI, part III, Figure S3B). In addition, the size distributions show that the casein micelles at pH 5.0 (Figure 2B) assume smaller dimensions than at pH 6.7, with a mean width and height of ~ 220 and ~ 50 nm, respectively. The aspect ratio h/w also moves to lower values (0.1–0.25) upon acidification as compared to $h/w \approx 0.3$ at pH 6.7. This suggests that the micelles shrink preferentially in the h direction when the pH is lowered. This is not surprising because the particles are covalently immobilized before acidification, thus preventing them from deforming equally in all directions.

On acidification, the casein micelles are known to undergo dramatic changes. In a first stage (i.e., from pH ~ 6 to ~ 5.2), the net charge of the caseins progressively decreases³⁴ and the CaP nanoclusters gradually dissolve off of the micelle.³⁵ In a second stage (i.e., at pH 5.2–5), the protruding ends of the κ -caseins, which electrosterically stabilize the native casein micelle, totally collapse so that milk gelation takes place.² As first shown qualitatively by Hooydonk et al.³⁶ and as was nicely demonstrated recently by Moitzi et al. using multiangle 3D light scattering,⁷ the continuing loss of charge during acidification makes the micelles shrink to smaller sizes. In the study by Moitzi et al., the diameter is decreased by 15% at pH 5.4, indicating a 40% volume loss. The present AFM results

strongly support this view, where the volume of the average micelle is found to decrease by ~50–75% at pH 5, a more advanced acidification stage. Note that in milk, up to ~30% w/w of the casein molecules have been reported to dissociate off of the micelle throughout acidification at pH 5.4 and then to reassociate partially with the micelle body from pH 5.4 to 5.^{7,37} The contribution of such a variation in mass to the volume reduction of the casein micelles at pH 5.0 is therefore also possible, although it is thought to be less than that of shrinkage.^{7,36}

Interestingly, the acid-induced compaction of the casein micelles is coincident with their surfaces appearing softer and smoother than at pH 6.7. As already mentioned, the charges on the casein molecules, including those of the phosphoserine residues after the dissolution of the CaP, are neutralized upon acidification. As a result, hydrophobic attractive bonds overcome electrostatic repulsions and internal rearrangements of weak bonds may take place.^{16,38,39} Again, a spongelike structure of the casein micelle could account for the compacted and softened aspect of the micelles at pH 5.0 as internal gaps would be closed during the rearrangement and packing process induced by the loss of CaP and the increase in net attraction between the proteins. Note that this view would also account for the SAXS results of Moitzi et al., who report that heterogeneities in the structure of the casein micelles disappear at acidic pH values.⁷

Although the experimental conditions intrinsically prevented aggregation and any related changes,^{7,38} it is finally important to note that Figure 4A,B shows the first experimental images of single, hydrated casein micelles as they may exist in yogurt gels. The results give precision to the possible structure of the adhesive casein spheres seen in SEM images of yogurt gels⁴⁰ or used to model fractal acid gels.¹⁴

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Results from dynamic light scattering experiments and some extra AFM images and cross-section profiles. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(F.G.) Tel: +33-223-48-53-47. Fax: +33-223-48-53-50. E-mail: fanny.guyomarch@rennes.inra.fr. (A.B.) Tel: +33-561-55-77-58. Fax: +33-561-55-61-39. E-mail: antoine.bouchoux@rennes.inra.fr.

Present Address

§CNRS, Laboratoire de Génie Chimique, 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The Asylum Research MFP3B-BIO atomic force microscope was funded by the European Union (FEDER), the French Ministry of Education and Research, INRA, Conseil Général 35, and Rennes Métropole. We gratefully thank Florence Rousseau, UMR STLO INRA-AGROCAMPUS OUEST, for DLS measurements.

■ REFERENCES

- (1) De Kruif, C. G. Casein Micelles: Diffusivity as a Function of Renneting Time. *Langmuir* **1992**, *8*, 2932–2937.
- (2) Tuinier, R.; De Kruif, C. G. Stability of Casein Micelles in Milk. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 1290–1295.
- (3) Walstra, P. On the Stability of Casein Micelles. *J. Dairy Sci.* **1990**, *73*, 1965–1979.
- (4) Mellema, M.; Leermakers, F. A. M.; De Kruif, C. G. Molecular Mechanism of the Renneting Process of Casein Micelles in Skim Milk, Examined by Viscosity and Light-Scattering Experiments and Simulated by Model SCF Calculations. *Langmuir* **1999**, *15*, 6304–6313.
- (5) Bomholt, J.; Moth-Poulsen, K.; Harboe, M.; Karlson, A. O.; Qvist, K. B.; Bjørnholm, T.; Stamou, D. G. Monitoring the Aggregation of Single Casein Micelles Using Fluorescence Microscopy. *Langmuir* **2011**, *27*, 866–869.
- (6) Dalgleish, D. G. On the Structural Models of Bovine Casein Micelles-Review and Possible Improvements. *Soft Matter* **2011**, *7*, 2265–2272.
- (7) Moitzi, C.; Menzel, A.; Schurtenberger, P.; Stradner, A. The pH Induced Sol–Gel Transition in Skim Milk Revisited. A Detailed Study Using Time-Resolved Light and X-ray Scattering Experiments. *Langmuir* **2011**, *27*, 2195–2203.
- (8) Shukla, A.; Narayanan, T.; Zanchi, D. Structure of Casein Micelles and Their Complexation With Tannins. *Soft Matter* **2009**, *5*, 2884–2888.
- (9) Glantz, M.; Håkansson, A.; Lindmark Månsson, H.; Paulsson, M.; Nilsson, L. Revealing the Size, Conformation, and Shape of Casein Micelles and Aggregates with Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multiangle Light Scattering. *Langmuir* **2010**, *26*, 12585–12591.
- (10) Jackson, A. J.; McGillivray, D. J. Protein Aggregate Structure under High Pressure. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 487–489.
- (11) Dalgleish, D. G.; Spagnuolo, P. A.; Goff, H. D. A Possible Structure of the Casein Micelle Based on High-Resolution Field-Emission Scanning Electron Microscopy. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 1025–1031.
- (12) Martin, A. H.; Goff, H. D.; Smith, A.; Dalgleish, D. G. Immobilization of Casein Micelles for Probing Their Structure and Interactions with Polysaccharides Using Scanning Electron Microscopy (SEM). *Food Hydrocolloids* **2006**, *20*, 817–824.
- (13) McMahon, D. J.; Oommen, B. S. Supramolecular Structure of the Casein Micelle. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 1709–1721.
- (14) De Kruif, C. G. Supra-Aggregates of Casein Micelles as a Prelude to Coagulation. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 3019–3028.
- (15) Holt, C. Structure and Stability of Bovine Casein Micelles. *Adv. Protein Chem.* **1992**, *43*, 63–151.
- (16) Horne, D. S. Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *Int. Dairy J.* **1998**, *8*, 171–177.
- (17) Bouchoux, A.; Gésan-Guizieu, G.; Pérez, J.; Cabane, B. How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles Under Osmotic Stress, a SAXS Study. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 3754–3762.
- (18) Holt, C.; De Kruif, C. G.; Tuinier, R.; Timmins, P. A. Substructure of Bovine Casein Micelles by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. *Colloids Surf., A* **2003**, *213*, 275–284.
- (19) Pignon, F.; Belina, G.; Narayanan, T.; Paubel, X.; Magnin, A.; Gésan-Guizieu, G. Structure and Rheological Behavior of Casein Micelle Suspensions During Ultrafiltration Process. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 8138–8146.
- (20) Marchin, S.; Putaux, J. L.; Pignon, F.; Léonil, J. Effects of the Environmental Factors on the Casein Micelle Structure Studied by Cryo Transmission Electron Microscopy and Small-Angle X-Ray Scattering/Ultrasmall-Angle X-Ray Scattering. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 045101–045110.
- (21) Gebhardt, R.; Doster, W.; Friedrich, J.; Kulozik, U. Size Distribution of Pressure-Decomposed Casein Micelles Studied by Dynamic Light Scattering and AFM. *Eur. Biophys. J.* **2006**, *35*, 503–509.

- (22) Uricanu, V. I.; Duits, M. H. G.; Mellema, J. Hierarchical Networks of Casein Proteins: An Elasticity Study Based on Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2004**, *20*, 5079–5090.
- (23) Helstad, K.; Rayner, M.; van Vliet, T.; Paulsson, M.; Dejmek, P. Liquid Droplet-Like Behaviour of Whole Casein Aggregates Adsorbed on Graphite Studied by Nanoindentation with AFM. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 726–738.
- (24) Metwalli, E.; Moulin, J. F.; Gebhardt, R.; Cubitt, R.; Tolkach, A.; Kulozik, U.; Müller-Buschbaum, P. Hydration Behavior of Casein Micelles in Thin Film Geometry: A GISANS Study. *Langmuir* **2008**, *25*, 4124–4131.
- (25) Müller-Buschbaum, P.; Gebhardt, R.; Maurer, E.; Bauer, E.; Gehrke, R.; Doster, W. Thin Casein Films as Prepared by Spin-Coating: Influence of Film Thickness and of pH. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1773–1780.
- (26) Famelart, M. H.; Lepesant, F.; Gaucheron, F.; Le Graet, Y.; Schuck, P. pH-Induced Physicochemical Modifications of Native Phosphocaseinate Suspensions: Influence of Aqueous Phase. *Lait* **1996**, *76*, 445–460.
- (27) Pierre, A.; Fauquant, J.; Le Graët, Y.; Piot, M.; Maubois, J. L. Native Micellar Casein Separation through Cross Flow Membrane Microfiltration. *Lait* **1992**, *72*, 461–474.
- (28) Schuck, P.; Piot, M.; Méjean, S.; Le Graët, Y.; Fauquant, J.; Brulé, G.; Maubois, J. L. Spray-Drying of Native Phosphocaseinate Obtained by Membrane Microfiltration. *Lait* **1994**, *74*, 375–388.
- (29) Gaiani, C.; Scher, J.; Schuck, P.; Hardy, J.; Desobry, S.; Banon, S. The Dissolution Behaviour of Native Phosphocaseinate as a Function of Concentration and Temperature Using a Rheological Approach. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1427–1434.
- (30) Jenness, R.; Koops, J. Preparation and Properties of a Salt Solution which Simulates Milk Ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.* **1962**, *16*, 153–164.
- (31) In this range of very low forces, changing the applied force had no effect on the AFM images, meaning that the micelle was not deformed by the tip when scanning. However, because the micelle is a soft object, it is possible that such a deformation occurs with stiffer cantilevers and/or higher tapping forces. See the following paper for further discussion: Barakat, A.; Gaillard, C.; Lairez, D.; Saulnier, L.; Chabbert, B.; Cathala, B. Supramolecular Organization of Heteroxylan-Dehydrogenation Polymers (Synthetic Lignin) Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 487–493.
- (32) Walstra, P. Casein Sub-Micelles: Do They Exist? *Int. Dairy J.* **1999**, *9*, 189–192.
- (33) Trejo, R.; Dokland, T.; Jurat-Fuentes, J.; Harte, F. Cryo-Transmission Electron Tomography of Native Casein Micelles From Bovine Milk. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 5770–5775.
- (34) Anema, S. G.; Klostermeyer, H. ζ -Potentials of Casein Micelles from Reconstituted Skim Milk Heated at 120 °C. *Int. Dairy J.* **1996**, *6*, 673–687.
- (35) Le Graet, Y.; Brulé, G. Effects of pH and Ionic Strength on Distribution of Mineral Salts in Milk. *Lait* **1993**, *73*, 51–60.
- (36) Van Hooydonk, A. C. M.; Hagedoorn, H. G.; Boerrigter, I. J. pH-Induced Physico-Chemical Changes of Casein Micelles in Milk and Their Effect on Renneting. I. Effects of Acidification on Physico-Chemical Properties. *Neth. Milk Dairy J.* **1986**, *40*, 281–296.
- (37) Dalglish, D. G.; Law, A. J. R. pH-Induced Dissociation of Bovine Casein Micelles. I. Analysis of Liberated Caseins. *J. Dairy Res.* **1988**, *55*, 529–538.
- (38) Horne, D. S. Formation and Structure of Acidified Milk Gels. *Int. Dairy J.* **1999**, *9*, 261–268.
- (39) Horne, D. S. Casein Micelles as Hard Spheres: Limitations of the Model in Acidified Gel Formation. *Colloids Surf., A* **2003**, *213*, 255–263.
- (40) Kalab, M.; Allan-Wojtas, P.; Phipps-Todd, B. E. Development of Microstructure in Set-Style Nonfat Yoghurt: A Review. *Food Microstruct.* **1983**, *2*, 51–66.

Supporting Information

AFM imaging of milk casein micelles: evidence for structural rearrangement upon acidification

Mustapha Ouanezar,^{†,‡} Fanny Guyomarc'h,^{†,‡,*}, Antoine Bouchoux^{†,‡,**}

[†]INRA, UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

[‡]AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

*Corresponding author 1. Tel: +33.223.48.53.47; Fax: +33.223.48.53.50;
fanny.guyomarch@rennes.inra.fr

**Corresponding author 2. Tel: +33.561.55.77.58; Fax: +33.561.55.61.39;
antoine.bouchoux@rennes.inra.fr; Present address: CNRS, Laboratoire de Génie Chimique,
118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France.

I. Size distributions

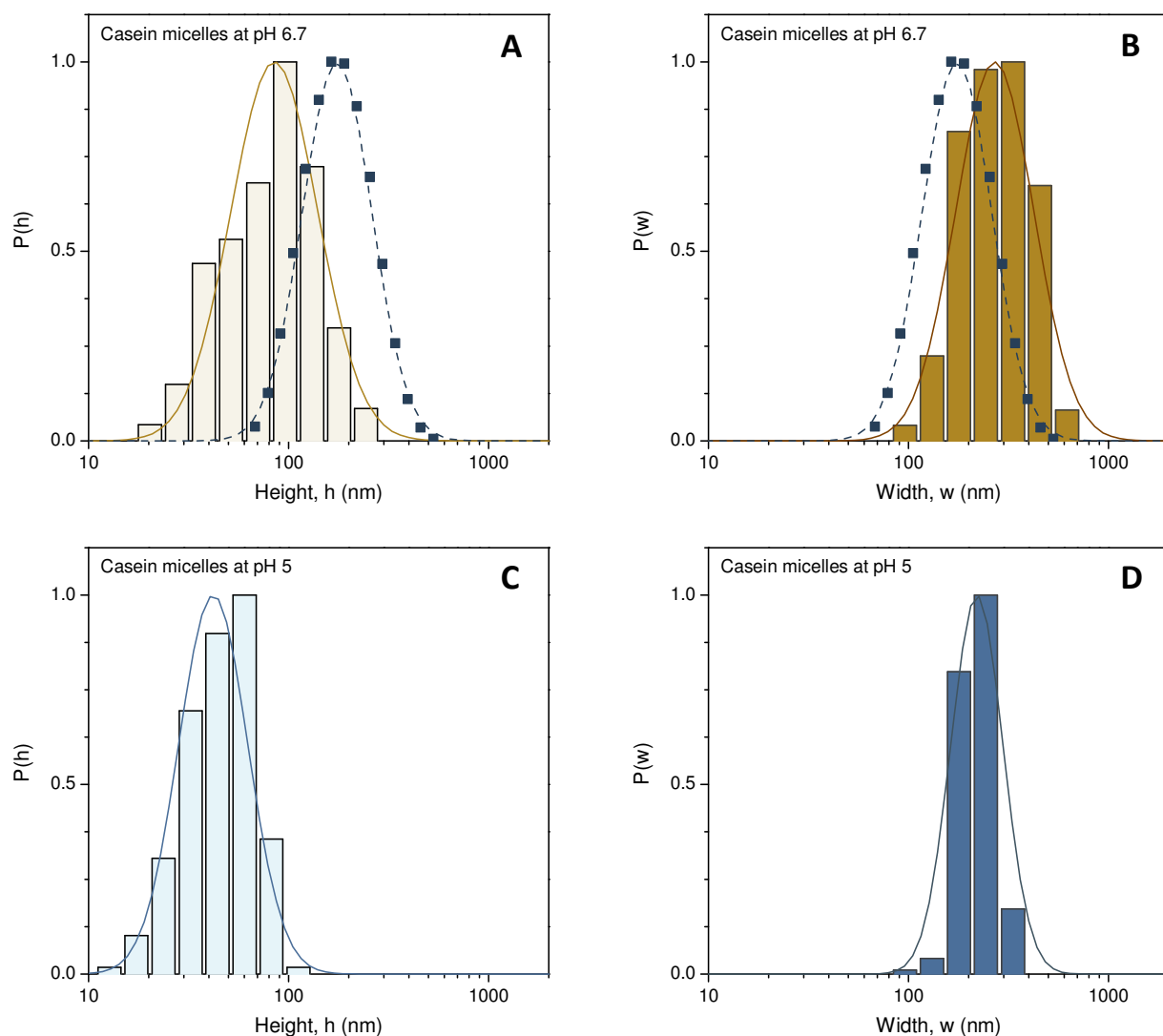


Figure S1. Size properties of casein micelles imaged in liquid through AFM in different conditions of pH. (A) and (C) are height distributions in close-to-native (pH 6.7) and in acidified (pH 5) conditions, respectively. (B) and (D) are the corresponding width distributions. The full lines are log-normal distributions that best fits the data. For comparison, the intensity size distribution obtained through DLS with the same casein micelle dispersion at pH 6.7 is given in (A) and (B) as solid squares.

The particle size distribution of the dialyzed casein micelle dispersions was determined at $\sim 1 \text{ g.kg}^{-1}$ in SMUF at 25°C (refractive index = 1.333, viscosity = 0.89 mPa.s) using a Zetasizer nanoZS dynamic light scattering (DLS) equipment ($\lambda = 633 \text{ nm}$, Malvern Instruments, Orsay, France). Figure S1 compares the DLS distribution with those of the height and width of individual casein micelles as measured by particle analysis of AFM images obtained in liquid,

at pH 6.7 (top; brown colour) or 5.0 (bottom, blue colour). The results show that in all experimental conditions or methods, the casein micelles show polydisperse dimensions with log-normal distributions. The mean DLS diameter is ~175 nm, in agreement with previous reports.^{1,2} At pH 6.7, the mean height and width of the casein micelles imaged by the AFM are ~100 and 300 nm, respectively; as a result of their deformation when covalently immobilized onto the gold surface.

II. Extra AFM images in air

When performing AFM observations in air, the topography of the dehydrated sample can reveal internal features.³ Different authors have used this approach to comment on the structure of casein micelles layers, but not individuals.⁴⁻⁶ Images of casein micelles covalently bound on gold surfaces then dehydrated are shown and discussed in the manuscript. As an alternative to chemical immobilization, physical adsorption onto mica surfaces was also attempted. Two μ l of a 25 g/L NMC dispersion (in MUF) were spread onto freshly cleaved mica and dried as described in the experimental methods. Using such physisorption on mica, no satisfying images could be obtained in liquid, probably due to desorption of the casein micelles by the SMUF.

On the other hand, imaging in air shows closely packed particles with the rough aspect of cauliflowers (Figure S2A). Calculations indicate that several layers of casein micelles were deposited onto the mica. For these reasons, neither the exact contours nor the sizes of the casein micelles can be defined using these images. However, topographical heterogeneity is visible at about the same length-scale, i.e. ~50 nm, as on the images of covalently-bound, individualized micelles (Figure 3). Dilution yielded images of disintegrated structures (Figures 4C and 4D). It suggests that close-packing the casein micelles is a requirement for maintaining their structure on hydrophobic surfaces.^{7,8} Providing these conditions, the

improved resolution brings further detail to the previous reports by Régnauld *et al.*,⁶ Müller-Buschbaum *et al.*,⁵ or Gebhardt *et al.*,⁴ who rather reported casein micelles with smooth surfaces.

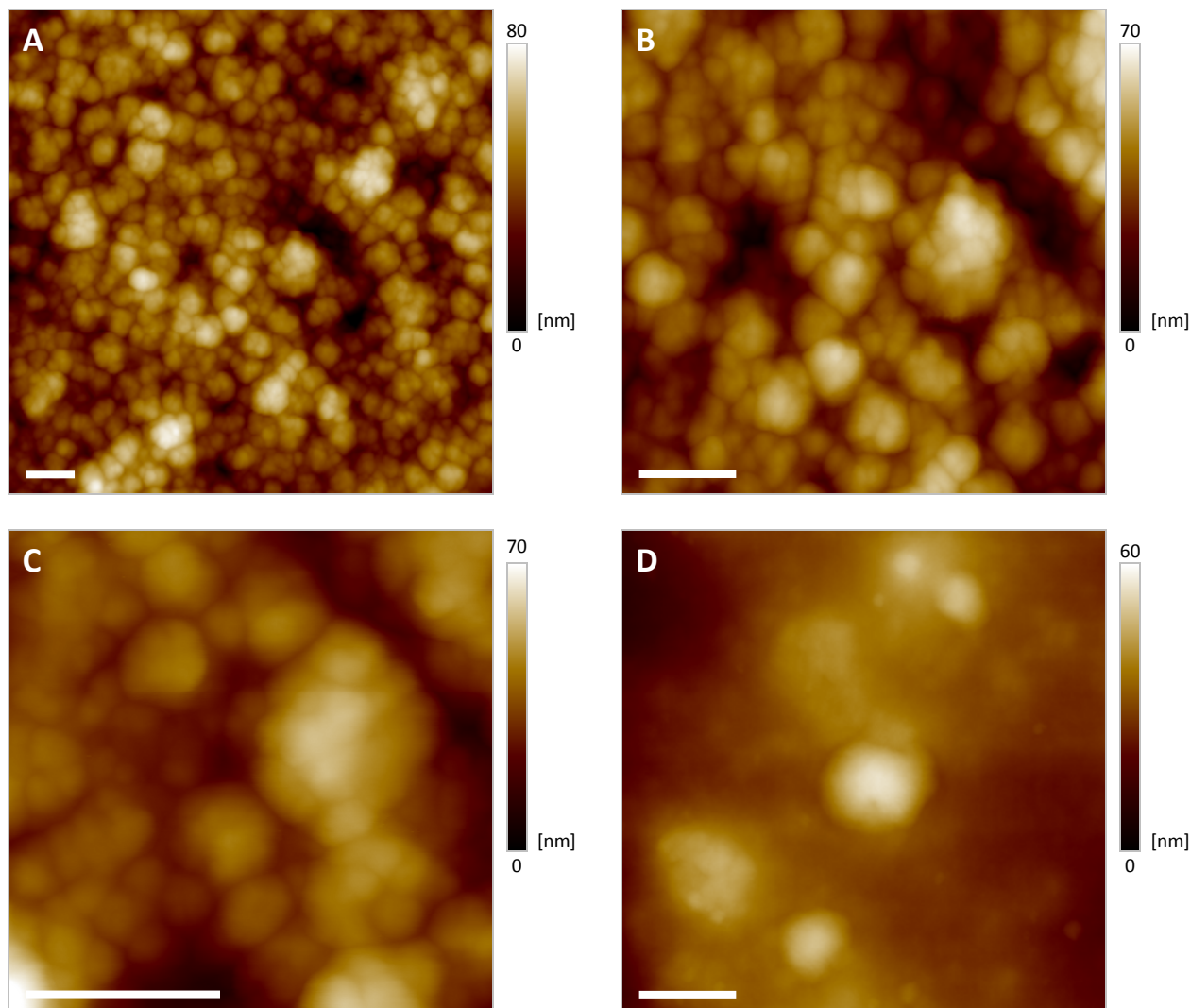


Figure S2. AFM height images of casein micelles simply deposited onto mica and subsequently dried. All images were taken in air. (A) to (C) are samples obtained from a 25 g/L dispersion of casein micelles at pH 6.7. (D) was obtained from a 2.5 g/L dispersion. The white scale bar is 200 nm.

III. AFM cross-section profiles

The following figure provides cross-sections of the individual casein micelles at pH 6.7 (Figure 3C in the manuscript) and 5.0 (Figure 4C in the manuscript) imaged in air. The cross-

sections are taken at the top of the casein micelle, where lateral effects on the tip are minimal, to evidence topographical differences between the two samples.

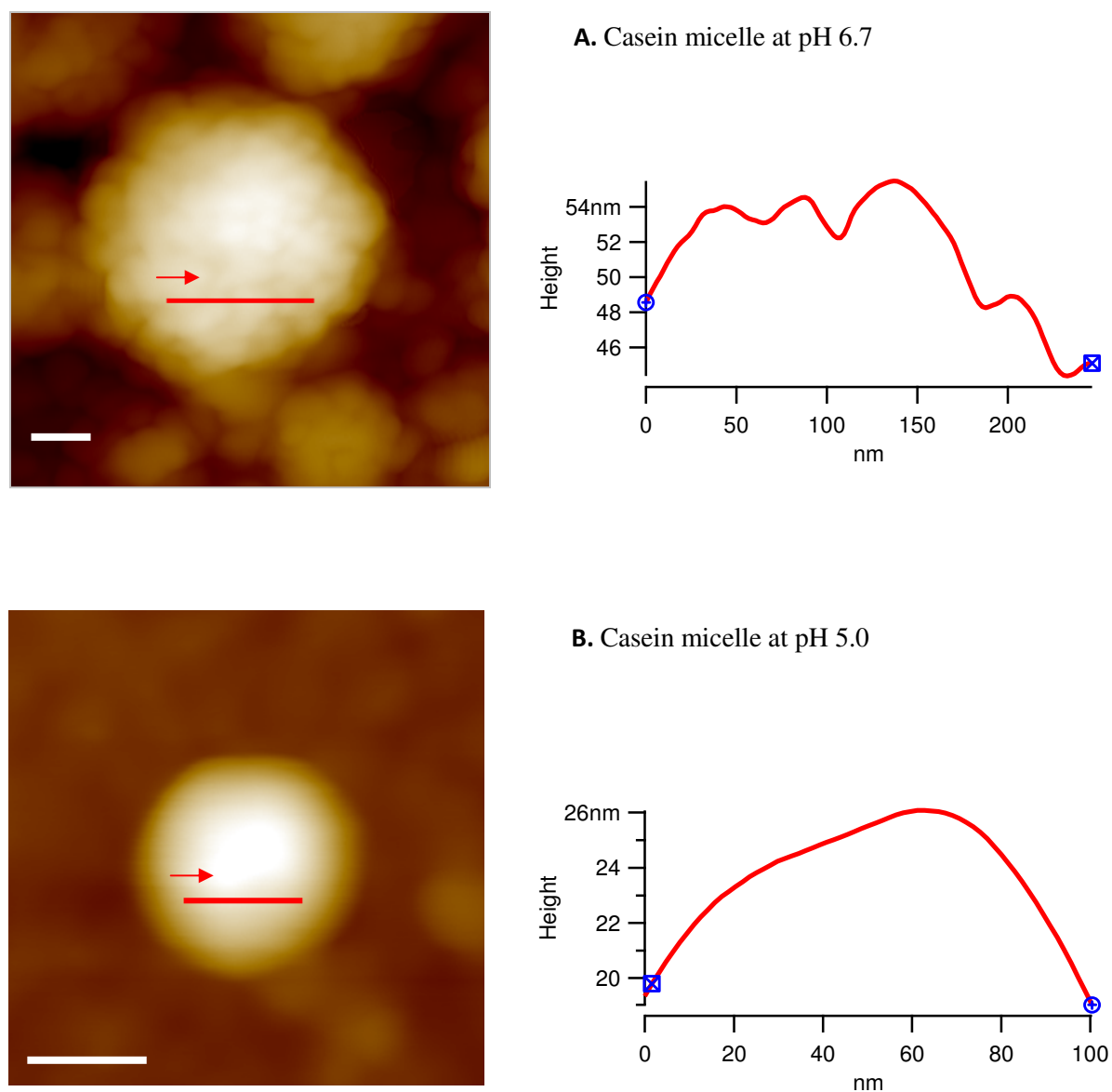


Figure S3. AFM height images and cross sections of individual casein micelles immobilized on gold surfaces at pH 6.7, immersed in SMUF at pH 6.7 (A) or 5.0 (B) then scanned in air after dessication. The red bars on the left locate the cross sections shown on the right. The white bar is 100 nm.

The cross-section at pH 6.7 clearly evidences the roughness of the surface of the dried casein micelle (Figure S3A), while that of the acidified micelle is smooth (Figure S3B). Figure S3A also illustrates that the typical length-scale of the bumps is 30-50 nm, as discussed in the manuscript.

References

- [1] De Kruif, C. G. Supra-Aggregates of Casein Micelles As a Prelude to Coagulation. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 3019-3028.
- [2] Holt, C. Structure and Stability of Bovine Casein Micelles. *Adv. Protein Chem.* **1992**, *43*, 63-151.
- [3] Morris, V.J.; Kirby, A.R.; Gunning, A.P. In Atomic Force Microscopy for Biologists; Morris, V.J., Kirby, A.R., Gunning, A.P., Eds.; Imperial College Press: London, UK, 2008; pp 254-310
- [4] Gebhardt, R. Structural Characterization of Casein Micelles: Shape Changes During Film Formation. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2011**, *23*, 444201.
- [5] Müller-Buschbaum, P.; Gebhardt, R.; Roth, S. V.; Metwalli, E.; Doster, W. Effect of Calcium Concentration on the Structure of Casein Micelles in Thin Films. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 960-968.
- [6] Regnault, S.; Thiebaud, M.; Dumay, E.; Cheftel, J. C. Pressurisation of Raw Skim Milk and of a Dispersion of Phosphocaseinate at 9°C or 20°C: Effects on Casein Micelle Size Distribution. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 55-68.
- [7] Dalgleish, D. G.; Spagnuolo, P. A.; Goff, H. D. A Possible Structure of the Casein Micelle Based on High-Resolution Field-Emission Scanning Electron Microscopy. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 1025-1031.
- [8] Helstad, K.; Rayner, M.; van Vliet, T.; Paulsson, M.; Dejmek, P. Liquid Droplet-Like Behaviour of Whole Casein Aggregates Adsorbed on Graphite Studied by Nanoindentation With AFM. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 726-738.

Annexe C-4

Bouchoux et al., Langmuir, 2014

A General Approach for Predicting the Filtration of Soft and Permeable Colloids: The Milk Example

Antoine Bouchoux,^{*,†,‡,⊥} Peng Qu,^{†,‡} Patrice Bacchin,^{§,||} and Geneviève Gésan-Guizieu^{†,‡}

[†]INRA, UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

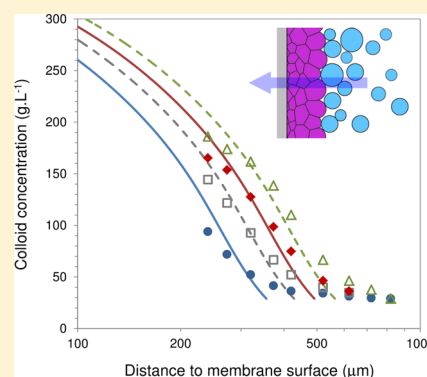
[‡]AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 STLO, F-35042 Rennes, France

[§]Université de Toulouse, INPT, UPS, Laboratoire de Génie Chimique, 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

[⊥]CNRS, UMR 5503, F-31062 Toulouse, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Membrane filtration operations (ultra-, microfiltration) are now extensively used for concentrating or separating an ever-growing variety of colloidal dispersions. However, the phenomena that determine the efficiency of these operations are not yet fully understood. This is especially the case when dealing with colloids that are soft, deformable, and permeable. In this paper, we propose a methodology for building a model that is able to predict the performance (flux, concentration profiles) of the filtration of such objects in relation with the operating conditions. This is done by focusing on the case of milk filtration, all experiments being performed with dispersions of milk casein micelles, which are sort of "natural" colloidal microgels. Using this example, we develop the general idea that a filtration model can always be built for a given colloidal dispersion as long as this dispersion has been characterized in terms of osmotic pressure Π and hydraulic permeability k . For soft and permeable colloids, the major issue is that the permeability k cannot be assessed in a trivial way like in the case for hard-sphere colloids. To get around this difficulty, we follow two distinct approaches to actually measure k : a direct approach, involving osmotic stress experiments, and a reverse-calculation approach, that consists of estimating k through well-controlled filtration experiments. The resulting filtration model is then validated against experimental measurements obtained from combined milk filtration/SAXS experiments. We also give precise examples of how the model can be used, as well as a brief discussion on the possible universality of the approach presented here.



1. INTRODUCTION

Membrane operations like ultra- or microfiltration are now extensively used in the industry for separating and/or concentrating colloidal particles (colloidal humic matter, mineral colloids, macromolecular drugs, proteins, etc.). In the past twenty years, considerable research effort has been devoted to understanding and modeling such filtration operations.¹ However, current approaches are still limited to monodisperse hard-sphere colloids, while the colloids encountered in the real world are often polydisperse, soft, deformable, and even porous. In this paper, we treat the generic problem of soft and permeable colloids, with the objective of proposing a methodology for building a filtration model for such objects.

Our experimental model system is the milk casein micelle, which is a "natural" equivalent to the artificial colloidal microgels that are now commonly used in the Soft Matter community (like poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) systems, for instance).^{2,3} Those micelles, which make up to 80% of the protein content of cow milk, are complex association colloids made of four distinct caseins (α_{s1} , α_{s2} , β , and κ) and 8% in mass of phosphate and calcium ions.⁴ They are highly polydisperse, with a vast majority of micelles with

diameters between 50 and 200 nm.^{5,6} Because they contain a lot of water in their internal core (about 76%), the casein micelles can literally be viewed as sponge-like colloids or microgels that are highly porous (and consequently permeable), and that can deform when compressed.^{5,7–10} The choice of the casein micelle is also motivated by the fact that milk filtration operations are widely encountered in the dairy industry,^{11,12} and it is now well established that the performance of ultra- and microfiltration in dairy processing are intimately linked to the presence of the casein micelles in milk and to their accumulation near the membrane surface.¹³ A filtration model would then be of considerable interest and benefit to this industry.

Since the pioneering works of Cohen and Probstein,¹⁴ and later of Belfort et al. and Bowen et al.,^{15,16} understanding and modeling the filtration of a colloidal dispersion has always been a challenge. We refer the reader to the review of Bacchin et al. for a detailed discussion and some historical considerations on

Received: July 26, 2013

Revised: November 27, 2013

Published: December 5, 2013

that point.¹⁷ Also, some other key references can be cited here, like those of Chen et al. and Elimelech et al., for instance.^{18–21} In brief, the particularity of colloidal filtration is that the interactions between and within the objects have dominant effects on the filtration performance,¹⁴ whereas hydrodynamic/shear-induced interactions are prevailing when filtrating micrometer-size particles.²² As a consequence, colloidal interactions have to be taken into account in a modeling approach. In latest developments, this is usually done through the use of the osmotic pressure Π as a quantitative descriptor of the colloidal interactions.^{16,23,24} The osmotic pressure of a colloidal dispersion indeed reflects the balance of all interactions in the system.^{25–28} It gives a measure of how the dispersion resists to an overall increase in its concentration: the higher its osmotic pressure, the harder it is to “compress” it. Besides osmotic pressure, another essential parameter that is necessary to accurately model the filtration of a colloidal dispersion is its permeability k , which measures the resistance of the system to the hydraulic flow that passes through it.^{29,30} As opposed to the osmotic pressure, k is a “structural” parameter that originates from the hydrodynamic drag forces exerted on the involved colloids and that is therefore directly related to their size and spatial organization.^{30,31} Of course, Π and k are both concentration-dependent parameters, and it is by knowing how Π and k evolve with concentration C for a given colloidal dispersion that the filtration model can be built.^{16,32} The model can then be used in several ways, like predicting concentration profiles and permeation volumes or fluxes versus time (note that a model of this type has been recently used for describing the concentration of colloids in microevaporators, in direct analogy with filtration³³).

This modeling approach has now been used for quite a number of colloidal objects, such as latex particles or globular proteins.^{1,16,23,34,35} The way the authors deal with the osmotic pressure and its variation with concentration varies from case to case. In some studies, the $\Pi(C)$ relation is measured experimentally, using the osmotic stress technique for instance.^{34,35} In other studies, the authors use theoretical expressions for $\Pi(C)$, those expressions often being based on the DLVO theory and therefore, depending on the size, the surface charge and some other properties of the colloid.^{1,16,23} On the other hand, for all the systems investigated so far, $k(C)$ is always taken as the theoretical permeability of a bed of noninteracting and nonporous hard spheres of size equivalent to the size of the colloid investigated. Mathematical expressions like the one of Happel are the most often used to estimate this permeability.^{1,16,34,35} In such expressions, $k(C)$ is only related to the size of the colloid and to the volume fraction occupied by the colloid in the dispersion.³⁶

In the cases investigated, the use of such theoretical expressions is possible because latex particles and globular proteins are, like hard spheres, nondeformable and nonpermeable. One clearly sees here that this approach cannot be followed entirely for soft and permeable objects. Indeed, while it is always possible to measure $\Pi(C)$ for any dispersion of soft colloids (and casein micelle dispersions in particular; see section 4.1), it is much more difficult to know how $k(C)$ varies with C in such a case. As opposed to hard spheres, which are nonpermeable objects that can pack to a maximum volume fraction of ~ 0.64 for the monodisperse case, deformable and porous particles can pack to concentrations that are much higher than the concentration for close-packing. Moreover, in these conditions of high concentrations, it is the internal

porosity of the objects that determines the permeability of the dispersion. In such a case, $k(C)$ is very difficult—if not impossible—to predict theoretically. With the present study, and taking the casein micelle as our model experimental system, our objective is to get around this difficulty and finally provide a model that is fully able to predict the filtration of a dispersion of soft and permeable colloids. Two approaches are presented for estimating $k(C)$. The first one consists of measuring $k(C)$ experimentally through specifically designed osmotic stress experiments. The other one, inspired from the work of Bowen et al.,^{1,37} consists of estimating $k(C)$ from dead-end filtration runs and from the known variation of Π with C .

As a final note, we emphasize that this work is dedicated to the dead-end filtration case only, and has to be considered as a first step toward the building of a model for industrial cross-flow filtrations. This last case, for which the effect of cross-flow velocity on the build-up of the accumulated layer needs to be taken into account, will be investigated in future studies.

2. THEORY

2.1. Filtration Model. Figure 1 gives a schematic view of how deformable colloids accumulate at a membrane surface in

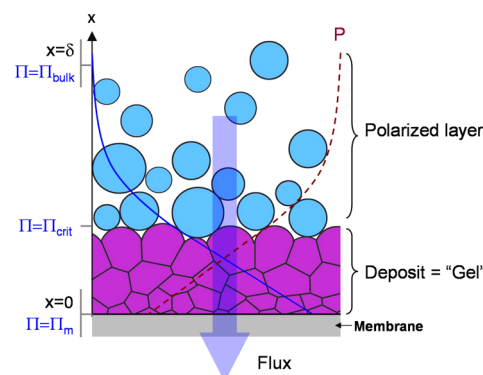


Figure 1. Schematic cartoon of soft colloidal particles accumulating at a membrane surface in dead-end filtration. The full and dashed lines illustrate how the osmotic pressure $\Pi(C)$ and the hydrostatic pressure P vary through the polarized layer and the deposit. At $\Pi(C) > \Pi_{crit}$, the polarized layer turns into an irreversible deposit that does not disperse when pressure is released.⁴⁰

dead-end filtration. The objects are of course the most concentrated at the membrane surface. In the depicted situation, the local concentration is such that the colloids are deformed and in contact with each other. In the case of casein micelles, this corresponds to the formation of a gel or irreversible deposit.^{13,38–40} Above this very dense layer, a polarized layer exists, where the objects are still more concentrated than in the bulk but where phase transition has not yet occurred. This phase transition can be characterized through a critical osmotic pressure Π_{crit} , as depicted in Figure 1.

Let us first consider the polarized layer only. In this layer, the solvent flux is governed by the solution thermodynamics. The effective driving force for permeation through the polarized layer is then simply the difference in osmotic pressure Π at its two ends.^{19,41} At steady state, and with the convention of Figure 1, this gives the following expression for the absolute value J of the solvent volumetric flux at any point of the polarized layer

$$J = -\frac{1}{\eta R_{PL}} \frac{d\Pi}{dx} = -\frac{k_{PL}}{\eta} \frac{d\Pi}{dx} \quad (1)$$

where R_{PL} is the resistance of the polarized layer to solvent flow at position x , $k_{PL} = 1/R_{PL}$ is the corresponding permeability of the polarized layer toward the solvent, and η is the dynamic viscosity of the solvent.

As it was carefully demonstrated by Elimelech et al.,¹⁹ the osmotic pressure difference across the polarized layer is in fact strictly equivalent to the cumulative hydrodynamic drag forces exerted on the particles. This implies that eq 1 can be expressed in terms of a hydraulic pressure drop across the polarized layer, the hydraulic resistance R and the permeability k being defined in the exact same way. This is the well-known Darcy's law that is commonly used in filtration theory

$$J = \frac{k_{PL}}{\eta} \frac{dP}{dx} \quad (2)$$

Let us now consider the gel layer. In that case, and like in the case of any porous media, the classical cake filtration theory directly applies. The permeation flux through the gel is then expressed in the same form as eq 2

$$J = \frac{k_{GEL}}{\eta} \frac{dP}{dx} \quad (3)$$

In cake filtration theory, the so-called "solid" (or compressive, or effective) pressure P_s is usually introduced at that point.^{42–44} This pressure reflects the "stress within the matrix of solid particles" that make the cake.⁴³ For a gel or a packing of microgel beads such as casein micelles, the effective pressure is nothing other than the osmotic pressure Π of the medium.^{28,45} The same equivalence as the one demonstrated by Elimelech et al.¹⁹ in the polarized layer can then be used for the gel/cake phase.^{42–44,46} This results in

$$\frac{dP}{dx} = -\frac{d\Pi}{dx} \quad (4)$$

in all positions of the gel. In other words, a drop in liquid pressure within the gel is always exactly balanced by an increase in osmotic pressure.

Quite naturally, eqs 3 and 4 then give

$$J = -\frac{k_{GEL}}{\eta} \frac{d\Pi}{dx} \quad (5)$$

which is the exact homologue of eq 1 but in the gel phase.

Thus from eqs 1 and 5, one can see that the permeation flux J , at steady state, can be described by the same single equation over the entire layer of material accumulated at the membrane surface, i.e., the polarized layer plus the gel layer. Taking explicitly into account the concentration dependence of both k and Π , this equation writes

$$J = -\frac{k(C)}{\eta} \frac{d\Pi(C)}{dx} \quad (6)$$

Equation 6 is the key equation used in the present work. It basically says that the filtration flux of a colloidal dispersion can be predicted knowing the variations of permeability and osmotic pressure with the concentration of colloids. Quite importantly, we believe that eq 6 is universal and can be applied to any colloidal dispersion, including "complicated" ones such as mixtures of several colloids and/or dispersions of soft colloids, for instance. In other words, it is possible from eq 6 to

predict a filtration flux of any colloidal dispersion as long as $k(C)$ and $\Pi(C)$ are known. Note that, for monodisperse hard-sphere colloids, we can actually demonstrate that the "generalized Darcy's law" of eq 6 is in fact equivalent to the convection–diffusion mass balance equation that is generally used for describing the concentration polarization phenomenon in such a peculiar case.^{1,16,23,32} We briefly discuss that point in the Supporting Information provided with this article.

As a side note, it is important to stress here that electroviscous effects can somewhat increase the apparent viscosity of the fluid at sufficient colloid concentrations (see ref 47 for details). This can be accounted for through an additional term in eq 6.¹⁶ However, we voluntarily neglect those effects, as they are known to be minor in most cases ($\times 1.4$ at max).

2.2. Modeling the Filtration from $k(C)$ and $\Pi(C)$. In dead-end filtration, the prediction of a flux from $k(C)$ and $\Pi(C)$ relies on a series of hypotheses and calculations that are given in detail in the papers of Bowen's and Bacchin's groups,^{1,16,23} and that we just briefly give here.

First, the quasi-stationary approximation is applied, meaning that the filtration is considered as a succession of stationary states for which eq 6 can be used as such. Multiplying eq 6 by C , we obtain

$$JCdx = -\frac{k(C)C}{\eta} d\Pi(C) \quad (7)$$

We then integrate eq 7 on the thickness δ of the accumulated layer

$$\int_0^\delta JCdx = -\int_0^\delta \frac{k(C)C}{\eta} d\Pi(C) \quad (8)$$

which simplifies in

$$J \int_0^\delta Cdx = \int_{\Pi_{bulk}}^{\Pi_m} \frac{k(C)C}{\eta} d\Pi \quad (9)$$

We now make the reasonable assumption that the full quantity of matter accumulated (polarized layer + gel, first integral in eq 9) is directly related to the filtered volume V_f and the bulk concentration of colloids C_{bulk} . We then have

$$JC_{bulk} \frac{V_f}{A_m} = \int_{\Pi_{bulk}}^{\Pi_m} \frac{k(C)C}{\eta} d\Pi \quad (10)$$

$$V_f = \frac{A_m}{JC_{bulk}\eta} \int_{\Pi_{bulk}}^{\Pi_m} k(C)C d\Pi \quad (11)$$

with A_m the membrane area.

The Darcy's law, expressed at the membrane surface, is also important since it directly relates J to the osmotic pressure Π_m at the membrane surface

$$J = \frac{\Delta P - \Pi_m}{\eta R_m} \quad (12)$$

with R_m the hydraulic resistance of the membrane.

Then, for a given transmembrane pressure ΔP , the calculation of V_f and J with filtration time t consists of the following steps: (a) Assume a given value of C_m , the concentration at the membrane surface. (b) Calculate Π_m knowing the relation between Π and C . (c) Calculate J from eq 12, knowing the membrane resistance. (d) Calculate V_f from eq 11, the integral term being estimated through either a numerical or graphical method and using the known variations

of $k(C)$ and $\Pi(C)$. (e) Reiterate steps (a)–(d) for other values of C_m covering the expected range of variation (from C_{bulk} to a realistic maximum value of C that can be attainable at the membrane surface). (f) When the values of V_f and J are known for a sufficient number of points, the time t necessary to filtrate one given volume V_f can be estimated through the following simple integration, again performed either numerically or graphically

$$t = \int_0^{V_f} \frac{1}{A_m J} dV \quad (13)$$

By performing step (f) for a number of points, we obtain the full variation of V_f and J with filtration time t .

Additional information that can be obtained at this point is the concentration and osmotic pressure profiles in the accumulated layer. To obtain those profiles, one first has to choose a filtration time t , which implies setting both a colloid concentration C_m and an osmotic pressure Π_m at the membrane surface (see preceding calculation). The C and Π profiles are then simply constructed by solving the following integral at different positions in the layer

$$x = \frac{1}{\eta J} \int_{\Pi}^{\Pi_m} k(C) d\Pi \quad (14)$$

This whole approach has been followed in some previous filtration studies involving dispersions of one "hard" (non-deformable) and nonporous colloid, like latex particles, for instance.^{1,16,23,34,35} In all cases, $k(C)$ is simply assumed to be the permeability of a bed of nonporous spheres, and is estimated through known mathematical expressions such as the Happel's equation.³⁶ Concerning $\Pi(C)$, theoretical expressions also exist for different colloidal systems: from the simple expressions of Carnahan–Starling for dispersions of non-interacting hard spheres to the more complicated DLVO-based expressions proposed by Bowen et al. for dispersions of interacting spheres.^{1,48} However, as far as a given colloidal system is concerned, and when it is possible, our advice is to determine experimentally the $\Pi(C)$ curve, since accurate osmotic pressure models are still lacking.^{26,27} Such an experimental determination of $\Pi(C)$ is usually performed through the osmotic stress technique.^{25,34,49}

2.3. Using the Model in a Reverse Way: Estimating $k(C)$ Knowing $\Pi(C)$ and $J(t)$. In this paper, we deal with dispersions of casein micelles, which are sponge-like objects that are both porous and deformable.^{5,7–10} As for other colloids, it is possible to determine the $\Pi(C)$ behavior of casein micelle dispersions through osmotic stress experiments (section 4.1 and ref 9). On the other hand, the $k(C)$ of casein micelle dispersions is both difficult to measure experimentally (last part of section 3.3) and nearly impossible to predict theoretically: mathematical expressions exist for dispersions of porous spheres,^{30,50} but they are still impractical as they rely on internal characteristics that are not known yet for casein micelles.

We propose here to estimate the $k(C)$ of casein micelle dispersions by using the filtration model of section 2.1 "reversely". That is to say, we propose to estimate $k(C)$ using $\Pi(C)$, known experimentally, and values of $J(t)$, also obtained experimentally through well-defined filtration runs. After $k(C)$ is determined in that way, our idea is that the knowledge of $k(C)$ and $\Pi(C)$ will make it possible to predict the filtration of casein micelle dispersions in absolutely any

conditions of filtration, simply by following the steps (a)–(f) found in the previous section. In many aspects, this proposition is similar to the one of Bowen et al. in 2001, who showed that it is possible to obtain $\Pi(C)$ for a protein dispersion, still using the model presented in section 2.1, but this time taking the Happel's equation for $k(C)$, and using $J(t)$ values obtained through dead-end filtration experiments.³⁷ In both cases (estimating $k(C)$ from $\Pi(C)$ and $J(t)$, or estimating $\Pi(C)$ from $k(C)$ and $J(t)$), the calculations are based on eq 10, which can be rewritten in the form

$$JV_f = \frac{A_m}{C_{\text{bulk}} \eta} \int_{\Pi_{\text{bulk}}}^{\Pi_m} k(C) C d\Pi \quad (15)$$

This equation can then be turned into the following time-dependent expression (see ref 16 for a detailed description of the mathematical manipulations that are performed)

$$JV_f = \frac{A_m}{C_{\text{bulk}} \eta} \int_0^t k(C_m) C_m \frac{d\Pi_m}{dt} dt \quad (16)$$

which gives, after differentiation

$$A_m J^2 + V_f \frac{dJ}{dt} = \frac{A_m}{C_{\text{bulk}} \eta} k(C_m) C_m \frac{d\Pi_m}{dt} \quad (17)$$

When differentiated with respect to time, eq 12 gives

$$\frac{dJ}{dt} = -\frac{1}{\eta R_m} \frac{d\Pi_m}{dt} \quad (18)$$

Then, by combining eqs 17 and 18, we obtain

$$k(C_m) C_m = -\frac{C_{\text{bulk}} \left(A_m J^2 + V_f \frac{dJ}{dt} \right)}{A_m R_m \frac{dJ}{dt}} \quad (19)$$

Thus, by performing filtration experiments where V_f and consequently J , are obtained as a function of time, we can simultaneously: (i) calculate the osmotic pressure at the membrane surface Π_m as a function of time using eq 12, and then determine the corresponding C_m at each time, and (ii) calculate the product $k(C_m) C_m$ as a function of time using eq 19. The permeability $k(C)$ is then obtained by computing the C_m and $k(C_m) C_m$ values at each time.

3. EXPERIMENTAL SECTION

3.1. Dispersions. All dispersions were prepared from native phosphocaseinate powder (NPC) dispersed in a solvent made from ultrafiltration of skimmed milk (UF permeate). The NPC powder was prepared in our laboratory following a protocol given by ref 51 and that we summarize in a previous paper.⁴⁰ In the powder, the caseins and their associated minerals make more than 90% of the total solid content.

The UF permeate solvent was prepared through membrane ultrafiltration of fresh skim milk (5000 Da cutoff). The totality of the milk protein fraction, i.e., caseins and whey proteins, is eliminated through this operation. The UF permeate contains the milk minerals, lactose, and a few other low molar mass molecules.⁵² Both thiomersal and sodium azide, purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), were added to the NPC dispersions as preservatives at 0.02% and 0.05% (w/w), respectively.

NPC dispersions with concentrations ranging from 1 to 120 g·L⁻¹ were prepared by thoroughly mixing the NPC powder in UF permeate for 15 h at 35 °C, a condition that ensures full dissolution of the powder.⁵³ For higher concentrations, additional NPC powder was added into a dispersion of 120 g·L⁻¹ and mixed for another 24 h at 35

°C. The method allows making NPC dispersions up to 180 g·L⁻¹ in concentration.

In NPC dispersions, the casein micelles are known to be in a structural state that is virtually identical to their native state in milk.⁵⁴ Also, NPC dispersions have the exact same pH and ionic strength as fresh skim milk, i.e., pH 6.7 ± 0.1 (20 °C) and ionic strength 80 mM. In those conditions, the casein micelles are very stable, predominantly because of the brush repulsion forces exerted by the ~10 nm κ -casein chains that protrude from their surface.^{55,56}

3.2. Osmotic Pressure Measurements. *Osmotic Stress.* The osmotic pressure of NPC dispersions at concentrations ranging from 30 to 700 g·L⁻¹ was measured using osmotic stress. This technique is based on water exchange between the sample and a polymer solution of controlled osmotic pressure.^{25,49} The sample (NPC dispersion) is placed in a dialysis bag that, in turn, is immersed in a reservoir containing a polymer solution (poly(ethylene glycol), PEG, in our case) also prepared with UF solvent. At equilibrium, i.e., after at least 14 days of compression, the chemical potentials of water on either side of the bag are equal, and therefore the osmotic pressure of the sample equals that of the polymer in the reservoir. The casein concentration in the bag is then determined through drying at 105 °C, thus giving one point $\Pi(C)$ of the osmotic pressure curve.

Experimentally, the osmotic stress was realized using standard regenerated cellulose Spectra/Por 2 dialysis bags with a molecular weight cutoff of 12–14 kD (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA). These bags were chosen to allow exchange of water, ions, and lactose, but not caseins or PEG. Two types of stressing polymers were used: a 20 kD and a 35 kD molecular weight PEG. Because of their size, those PEG molecules are supposed not to pass through the dialysis bags of 12–14 kD (even if "reptation" events cannot be excluded; see next paragraph). Solutions of PEG were prepared at different osmotic pressures by dispersing the PEG polymer in UF permeate. For both solutions, the relation between osmotic pressure Π (bar) and PEG concentration [PEG] (% w/w) is expressed as follows^{9,57}

$$\log(\Pi \times 10^5) = A + B[\text{PEG}]^C \quad (20)$$

with $A = 0.49$, $B = 2.5$, and $C = 0.24$ for PEG 35 kD, and $A = 0.57$, $B = 2.75$, and $C = 0.21$ for PEG 20 kD.

PEG 35 kD was used to prepare stressing solutions at pressures from 1000 Pa to a maximum of 4 bar, i.e., a pressure that corresponds to the maximum of solubility for this polymer in an aqueous solvent. PEG 20kD, which has a much higher solubility, was used to prepare stressing solutions at pressures ranging from 5 to 100 bar. We preferred to use two PEG molecules, and not only PEG 20 kD, for preparing our solutions because of the proximity between 20 kD molecular mass and the 12–14 kD cutoff of the dialysis membrane (lower cutoff are available, but with a much lower permeability). At pressures higher than 5 bar, this proximity is not a problem since the NPC dispersions are solid gels, thus ensuring that the possible migration/reptation of PEG molecules into the bags is strongly limited. At lower pressures, such a phenomenon cannot be excluded, and that is why we used a polymer of higher molecular mass (35 kD) in this case.

Membrane Osmometry. The osmotic pressure of NPC dispersions was also measured using a membrane osmometer. The instrument we used (Osmomat 090, Gonotec, Berlin, DE) is limited to low osmotic pressures (<7000 Pa), which correspond to the pressures measured for NPC dispersions with casein concentrations ranging from 1 to 180 g·L⁻¹.

A membrane osmometer is composed of two compartments of constant volumes that are separated by a membrane of a given molecular weight cutoff. The sample is introduced in one compartment, while the solvent (UF permeate in our case) is introduced in the other compartment. The induced osmotic pressure difference is then directly measured via a pressure transducer placed in the solvent side. For making our experiments, we used a 10 kD regenerated cellulose membrane supplied by Gonotec. Also, we performed experiments with either "fresh" (= freshly prepared, 0 day) or "aged" (14 days) NPC

dispersions to examine the impact of casein proteolysis on osmotic pressure (section 4.1).

3.3. Permeability Measurements. *From Dead-End Filtration Runs.* The filtration apparatus we used is depicted in Figure 2. It

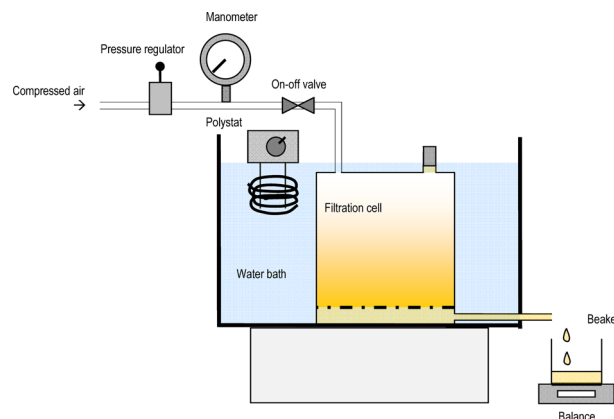


Figure 2. Schematic diagram of the dead-end filtration apparatus.

consists of a cell filtration of volume 2500 mL (model 2000, Millipore, Billerica, MA, USA) that accepts membranes with an effective area of 165 cm². Experiments were all performed with regenerated cellulose ultrafiltration membranes of 10 kD MWCO (Ultracel membrane, Millipore). Before each experiment, the hydraulic resistance R_m of the membrane was determined by filtering pure UF permeate. Note that the flux was always fully recovered (±5%) after each experiment and extensive membrane flushing; indicating that membrane internal fouling was negligible and that R_m can be considered constant during the course of the filtration.

All filtration experiments were performed with 1 g·L⁻¹ NPC dispersions. We chose such a low concentration, which is more dilute than that of casein in milk (~25 g·L⁻¹), to determine the permeability in a concentration range that also covers the very dilute regime. The dispersions were filtered under constant applied pressures ranging from 0.1 to 4 bar. The permeate solvent was collected in a beaker placed on an electronic balance linked to a computer, allowing the weight of permeate to be collected with time. All filtrations were performed at 20 °C, the filtration cell being immersed into a water bath at a controlled temperature.

The weight of permeate was converted into a volume knowing the density of UF permeate ($\rho_{\text{UF}} = 1023 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, determined using a DMR 48 density meter, Anton Paar, AU). The filtration flux was then calculated by differentiating the volume data versus time, using Taylor's expressions like those given by Bowen et al.³⁷

From Osmotic Stress Experiments. Imagine an infinite "slice" of NPC dispersion, the casein concentration in this slice being uniform and constant at C_{slice} . The thickness of the slice is e , and we assume that a hydrostatic pressure difference ΔP is applied through the slice. The resulting hydraulic flux would then simply be

$$J = \frac{k(C_{\text{slice}})}{\eta} \frac{\Delta P}{e} \quad (21)$$

By performing such an experiment with slices of different concentrations, it is theoretically possible to build the $k(C)$ curve for NPC dispersions. Of course, it is difficult to do such a "perfect" experiment in the real world. There is, however, one way to approach the ideal conditions of the "slice experiment". The whole idea is based on the osmotic stress principle explained in section 3.2. An NPC dispersion is first equilibrated at a given osmotic pressure Π through osmotic stress (Figure 3a, left cartoon). After equilibrium is reached, the casein concentration in the bag is uniform. The bag is then placed in a reservoir of osmotic pressure $\Pi + \Delta\Pi$, $\Delta\Pi$ being only a small pressure increment compared to Π . Because of the difference in osmotic pressure between the bag and the reservoir, the NPC

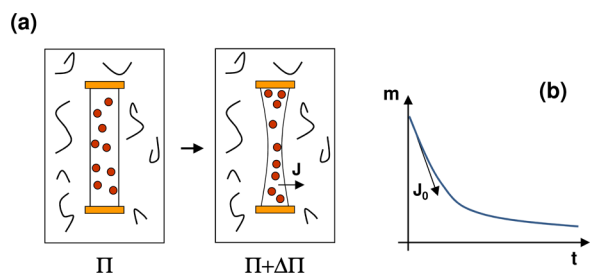


Figure 3. Determination of permeability $k(C)$ from osmotic stress experiments.

dispersion in the bag will compress to a higher concentration (Figure 3a).

During this compression, the mass of the bag is followed by weighing at different times. From these masses, it is then possible to obtain the flux J_0 of solvent that escapes from the bag at $t = 0$ (Figure 3b). Following eq 21, and neglecting the hydraulic resistance of the bag, this flux can be expressed as

$$J_0 = \frac{k(C_{\text{bag},t=0})}{\eta} \frac{(\Pi_{\text{reservoir}} - \Pi_{\text{bag},t=0})}{e_{t=0}} = \frac{k(C_{\text{bag},t=0})}{\eta} \frac{\Delta\Pi}{e_{t=0}} \quad (22)$$

with $e_{t=0}$ the thickness of the equivalent "slice". As a first approximation, it can be estimated as the volume of the bag V_{bag} divided by its surface A_{bag}

$$e_{t=0} = \frac{V_{\text{bag}}}{A_{\text{bag}}} = \frac{\rho_{\text{cas}} M_{\text{cas}}}{A_{\text{bag}}} \quad (23)$$

where M_{cas} is the total mass of casein in the bag, as determined through drying at 105 °C after the experiment. ρ_{cas} is the density of the casein dispersion, calculated knowing $C_{\text{bag},t=0}$ and using a density calibration curve determined from measurements performed beforehand (DMR 48 density meter, Anton Paar, AU).

From eqs 22 and 23, it is then possible to calculate the permeability k at casein concentration $C_{\text{bag},t=0}$. Note that this method is only valid at time $t = 0$ since it is the only moment where the concentration in the bag (and consequently the permeability) can be considered uniform. Indeed, as compression occurs, colloidal reorganizations in the bag most probably happen. This leads to temporary structural inhomogeneities that prevent consideration of a uniform permeability in the bag. Note also that such experiments are difficult to prepare and perform, so that we only show here the results of 4 of them.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Osmotic Pressure $\Pi(C)$. Figure 4 gives the osmotic pressures measured for the NPC dispersions used in this work. The results obtained from osmotic stress combine two sets of data that were acquired by two distinct individuals at an interval of several years (this work and ref 9). As already pointed in the Experimental Section, 14 days of compression was required to reach thermodynamic equilibrium in those experiments. On the other hand, the membrane osmometry experiments were performed for the purpose of the present study only. In membrane osmometry, it takes between a few minutes and one hour of equilibration to get one point. Using this technique, it was then possible to measure the osmotic pressure of a "fresh" NPC dispersion (just after preparation) and of the same dispersion but after 14 days at ambient temperature.

For the purpose of the following discussion, it is useful to know the effective volume fraction ϕ that is occupied by the casein micelles at different casein concentrations. ϕ is simply calculated through

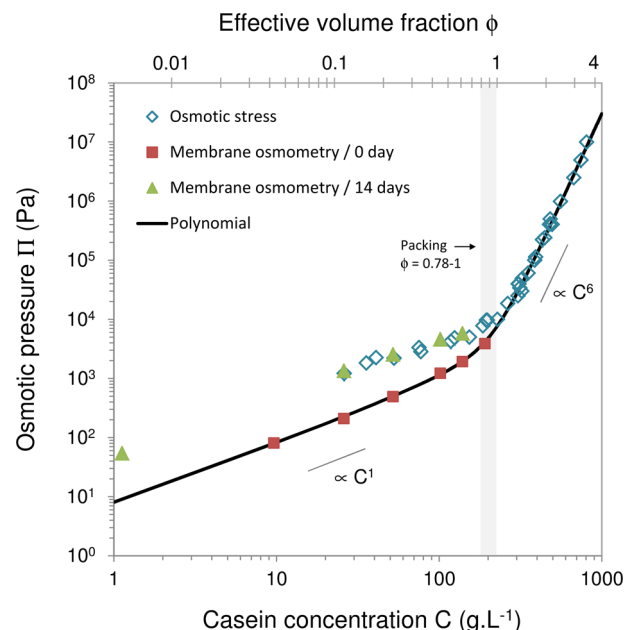


Figure 4. Evolution of osmotic pressure Π as a function of casein concentration and effective volume fraction. The open diamonds are the experimental points obtained through osmotic stress experiments (present work and ref 9). The full symbols are the experimental points obtained through membrane osmometry with either fresh (squares) or aged (triangles) NPC dispersions. The full line is eq 26.

$$\phi = \nu C \quad (24)$$

with ν the initial "voluminosity" ν of the micelle, taken as $\nu = 4.4$ mL per gram of caseins.⁶ ϕ is displayed on the top x-axis of Figure 4.

Looking at Figure 4, one can easily observe that osmotic pressure evolves differently with C at low and high casein concentrations. This two-regime behavior is a feature that we already report and discuss in a previous paper.⁹

In the low concentration regime ($C < 180$ g·L⁻¹), the osmotic pressure is directly proportional to the concentration of casein ($\Pi \propto C^1$, Figure 4). In this regime, we previously demonstrated through precise rheological measurements that the casein micelles strictly behave as hard spheres in a liquid; meaning that they are still separated from each other and interact through excluded volume effects only.³⁸ The maximum concentration of 180 g·L⁻¹ corresponds to a volume fraction $\phi = 0.78$. This last value exceeds the random close packing limit for monodisperse hard spheres ($\phi_{\text{cp}} = 0.64$) simply because the casein micelles are 30–40% polydisperse spheres that can pack more efficiently than monodisperse ones. Also, the fact that the micelles interact through excluded volume effects only is explained by the high ionic strength of the dispersion (= low if not inexistent electrostatic repulsions) and the absence of brush repulsion forces as long as there is no direct contact between two neighboring micelles. In such "nonrepulsive" situations, the osmotic pressure is directly related to the total number n of species in the dispersion according to the Van't Hoff's law

$$\Pi = \frac{n}{V} RT \quad (25)$$

This simple relation readily explains the linear dependence of Π with casein concentration C . In addition, we can show that n not only counts the total number of casein micelles in the dispersions, but also counts some small peptides and casein

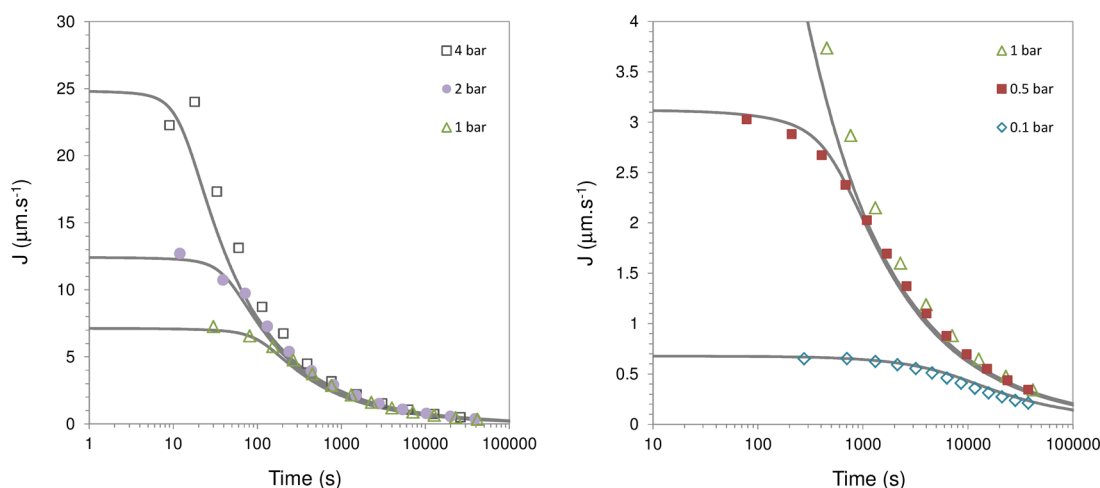


Figure 5. Evolution of permeation flux J as a function of time for dead-end ultrafiltrations of NPC dispersions at different transmembrane pressures. The symbols are the experimental data. The lines are the predictions obtained using the filtration model (procedure of section 2.2) and assuming that Π and k evolves with C according to eqs 26 and 28, respectively. The results are presented in a semilog plot to better visualize the data at small filtration times.

fragments that are in fact retained by the dialysis membrane during osmotic stress (see ref 9 for a detailed discussion). Those small species are initially present in the NPC powder at a very low mass concentration. Their number density is, however, very high. Also, when the powder is dispersed in an aqueous solvent, their number density increases with time as a result of proteolysis, this phenomenon being due to the presence of a small amount of enzymes (plasmin) in the NPC powder. This is demonstrated here by the fact that higher osmotic pressures are measured for a NPC dispersions aged of 14 days (Figure 4; quite consistently, these pressures also exactly correspond to the pressure measured using osmotic stress after 14 days of dialysis).

In the concentrated to very dense concentration regime ($C > 180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), the osmotic pressure rises approximately as the sixth power of concentration (Figure 4). Phase transition actually occurs at the entry of this regime, and the samples all behave as coherent solids or gels in this concentration range.^{9,38} This phase transition is due to direct interactions between the casein micelles when they are forced to get into close contact, i.e., when ϕ exceeds 0.78. As concentration is further increased, the casein micelles are forced to deform and de-swell. Effective volume fractions superior to 1 are reached, clearly indicating that the micelles have shrunk to a lower volume. In this second concentration regime, and in direct contrast to the first regime, the osmotic pressure is related to the strong interactions between (= surface interactions) and inside (= compression resistance) the casein micelles.⁹ It is because such strong and direct interactions are involved that the osmotic pressure rises so fast with casein concentration. This also implies that the contribution of the small species to the osmotic pressure can be totally neglected in this second regime.

Altogether, the results of Figure 4 can be used to obtain an analytical expression for the evolution of Π with C . In our case, we are interested in the $\Pi(C)$ relation for a "fresh" dispersion of casein micelles, as we aim to build a filtration model for this very case. We choose the following expression, which is a simple polynomial function that fits our data in a very acceptable manner (Figure 4)

$$\Pi(\text{Pa}) = aC + bC^2 + cC^3 + fC^6 \quad (26)$$

with C expressed in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $a = 8$, $b = 3 \times 10^{-2}$, $c = 1 \times 10^{-5}$, and $f = 3 \times 10^{-11}$.

4.2. Permeability $k(C)$. The permeability $k(C)$ of the NPC dispersions was estimated using two different approaches. The first approach lies on the reverse calculation of $k(C)$ using the filtration model of section 2 and following the procedure detailed in section 2.3. For this purpose, the evolution of Π versus C is needed, which is the eq 26 we just determined. Some filtration data are also required to make the calculations (see eq 19). We report the data used in our case in Figure 5. Those results correspond to five dead-end filtration experiments performed at transmembrane pressures ranging from 0.1 to 4 bar. The resulting values of k are given in Figure 6. The second approach consists of measuring k by monitoring the kinetics of compression in osmotic stress experiments. Four experiments of this type were performed. The k values are also reported in Figure 6.

A first and quite reassuring remark is that the k points (Figure 6), despite being obtained in different pressure conditions and/or with different techniques, appear to be distributed over one single curve. This curve covers 4 decades of k values, with a permeability that decreases with C in a monotonous way. As for the osmotic pressure, we then propose to discuss these results by considering two concentration regimes.

Before Close-Packing/Dilute Regime ($C < 180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). In this first regime, and as already explained, the micelles are still separated from each other, meaning that there is still plenty of interstitial space between them where liquid can flow. In that case, it seems judicious to compare our results with the predictions for a system of hard and nonporous spheres. The permeability of such a dispersion can be estimated from the Happel's equation³⁶

$$k_{\text{Happel}} = \frac{2r_p^2}{9\phi} \frac{6 - 9\phi^{1/3} + 9\phi^{5/3} - 6\phi^2}{6 + 4\phi^{5/3}} \quad (27)$$

with r_p the radius of the involved particles and ϕ the volume fraction occupied by the particles. Taking the voluminosity of the casein micelle and an average particle radius of 50 nm,⁵ we obtain the dashed curved of Figure 6 (Happel (1)). In the

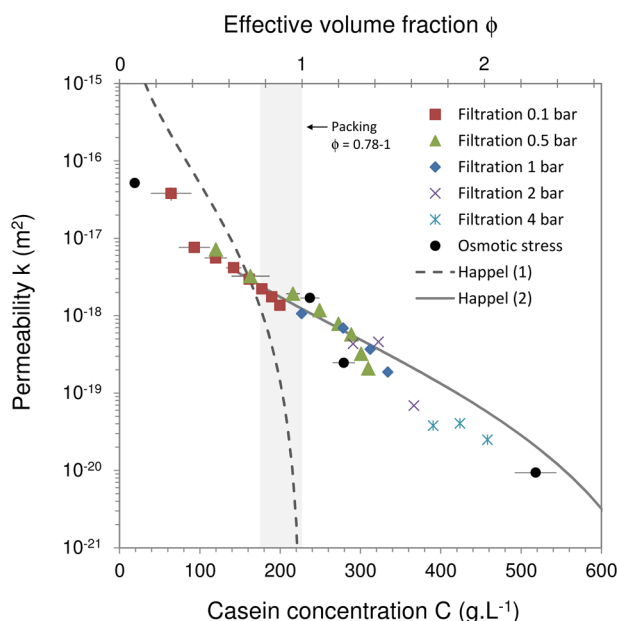


Figure 6. Evolution of the permeability k of the NPC dispersions as a function of casein concentration and effective volume fraction. Those k values were obtained both from osmotic stress experiments (closed circles) and from the filtration data of Figure 5 using the procedure of section 2.3 (other symbols). The shaded area gives the region where phase transition occurs; which corresponds to a packing fraction ϕ between 0.78 and 1 ($180\text{--}230\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, eq 24 with voluminosity $\nu = 4.4\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$).^{9,38,58} The results are compared with the permeability of monodisperse nonporous hard sphere dispersions as calculated from the theoretical expression of Happel (eq 27): Happel (1) (dashed line) = objects of 100 nm in diameter and voluminosity $\nu = 4.4\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, Happel (2) (full line) = objects of 8.8 nm in diameter and $\nu = 1.4\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$.

concentration regime that we consider here, we clearly see that all the measured permeabilities are lower than the prediction for hard spheres. As the Happel's approximation is for nonpermeable and monodisperse hard-spheres, two possible reasons come to mind for explaining this difference: (i) the size polydispersity of the micelles; (ii) the porosity of the micelles. However, if we now look at the theory, we can actually demonstrate that none of these reasons are in fact valid. The effect of polydispersity on the permeability of a bed of hard spheres has been investigated in the work of Li and Park.⁵⁹ These authors show that a broad distribution of size, as in the case of casein micelle,^{5,6} indeed leads to a lower permeability as compared to the monodisperse case. However, this effect is relatively tenuous, and cannot explain the large difference that we observe. The effect of porosity is even less equivocal. Indeed, theoretical works have clearly demonstrated that dispersions of porous spheres always have higher permeabilities than dispersions of nonporous spheres of the same size.^{30,50} So as the properties of the casein micelle alone do not seem to explain our results, we speculate that the low permeabilities we measure are partly due to other species present in the dispersions, those species being the small peptides and casein fragments that are already responsible for the high osmotic pressures measured at low casein concentration.⁹ Of course, this is only a qualitative assessment at that point, which would need to be verified in future studies.

After Close-Packing/Dense Regime ($C > 180\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). At the entry of this regime (packing zone, $\phi = 0.78\text{--}1$), the

permeability of the hard sphere system diverges toward zero (dashed line, Figure 6). This is readily explained by the fact that the interstitial spaces between the spheres are progressively closed. On the other hand, the permeability of the NPC system does not diverge at all, and still continues to slowly and regularly decrease with C . This is a direct effect of the internal porosity of the micelle as compared to nonporous hard spheres: the fluid gets forced through the micelle as the intermicellar voids are progressively closed. (As a side-effect, we can reasonably assume that the contribution of the small species to k tends to become negligible when reaching such high volume occupancy.) After close-packing, and especially at sufficiently high concentrations where $\phi > 1$, the dispersion turns into a cohesive gel in which the micelles are in direct contact and "squeezed" against each other. If we assume that the gel is homogeneous and lacks microfractures or other local heterogeneities, the permeability of the system is then entirely determined by the internal structure and porosity of the casein micelle itself. In that case, it is difficult to compare our results with theoretical expressions for porous systems, especially because we are still lacking the fine structural details that would be necessary to inject in such models (internal tortuosity? presence or not of internal voids? Mesh size of the casein network?). However, there is one very simplified model that can be tested, and that we already used for explaining the osmotic pressure of the casein micelle in the very dense regime.⁹ In this model, the micelle interior is described as a collection of nonconnected hard spheres that occupy a fraction ϕ of the total volume of the micelle. Still using the Happel expression, and by taking the size ($r_p = 4.4\text{ nm}$) and the voluminosity ($\nu = 1.4\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) of these substructures as identical to those used in our previous paper, we obtain the dashed gray curve of Figure 6. One can see that the correspondence with our experimental results is quite good. Of course, this view of a micelle composed of noninteracting spheres cannot be taken as realistic. There is however a certain physical meaning behind the use of such a model. We refer the reader to a previous paper for a detailed discussion on that point.⁹

Empirical Equation for $k(C)$. One important objective of section 4.2 is to obtain an empirical expression for k versus C . This expression is then used for modeling the filtration of NPC dispersions (next section). We propose to employ the following function, drawn in Figure 7

$$k(\text{m}^2) = \frac{1}{a'C + b'C^2 + f'C^6} \quad (28)$$

with C expressed in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $a' = 9.2 \times 10^{14}$, $b' = 1.1 \times 10^{12}$, and $f' = 4.6 \times 10^3$.

Note that this expression is based on the fact that k varies with C in a fashion that is quite similar to that of Π with C (slope of ± 1 at low concentrations, and slope of ± 6 at high concentrations). Such a similarity between Π and k may be fortuitous, or may have a physical explanation. We do not have an answer to this question yet.

4.3. Analysis of the Resulting Filtration Model. Now that we have two analytical expressions for $\Pi(C)$ and $k(C)$, we can build and use the filtration model of section 2. A first test of the model consists of predicting the filtration fluxes for the conditions of the filtration runs we already performed (Figure 5). For that purpose, we use the procedure given in section 2.2 and the adequate values of transmembrane pressure, casein concentration, and membrane resistance. The fluxes obtained

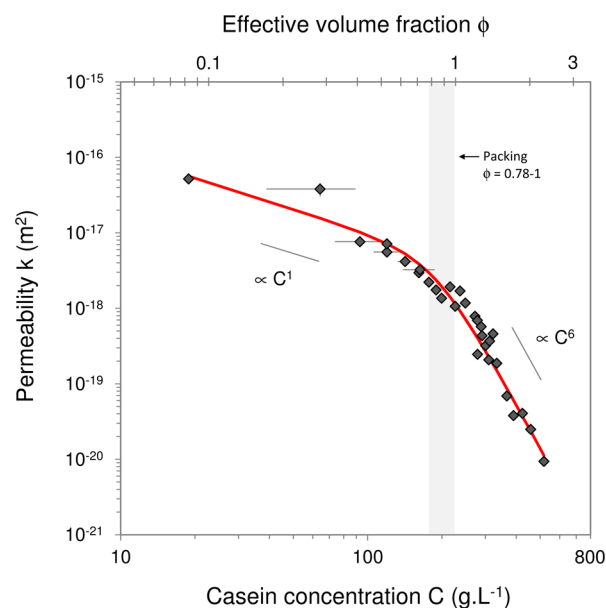


Figure 7. Empirical expression for $k(C)$. The symbols are the experimental data. The full line is eq 28.

are shown in Figure 5 as full lines. One sees that the correspondence between the model and the experimental data is very satisfactory. Of course, we are not doing a "validation" of the model here as the experimental data of Figure 5 are the values we used to build the model. However, this test is useful because it shows that the analytical expression chosen for $k(C)$ efficiently captures the "true" variation of permeability over the entire range of concentration investigated during the filtration (from $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the bulk to the maximum concentration that can be attained at the membrane surface, i.e., almost $500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ at $\Delta P = 4 \text{ bar}$). Incidentally, this test also shows that we did not make any mistake in deriving and using the equations given in section 2.

To analyze the physics of the local accumulation of casein micelles, let us now consider the "virtual" dead-end filtration of a NPC dispersion with $C_{\text{bulk}} = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; the membrane resistance being arbitrarily set to $R_m = 1 \times 10^{13} \text{ m}^{-1}$. For a given transmembrane pressure ΔP , the model is not only able to predict the flux versus time, but can also give the evolution of the osmotic pressure Π_m at the membrane surface versus time. This is what we do in Figure 8, where both J and Π_m are plotted against time for three values of ΔP . Π_m can in turn be compared to the critical osmotic pressure Π_{crit} , i.e., the pressure at which phase transition occurs (Figure 1). In a recent paper,

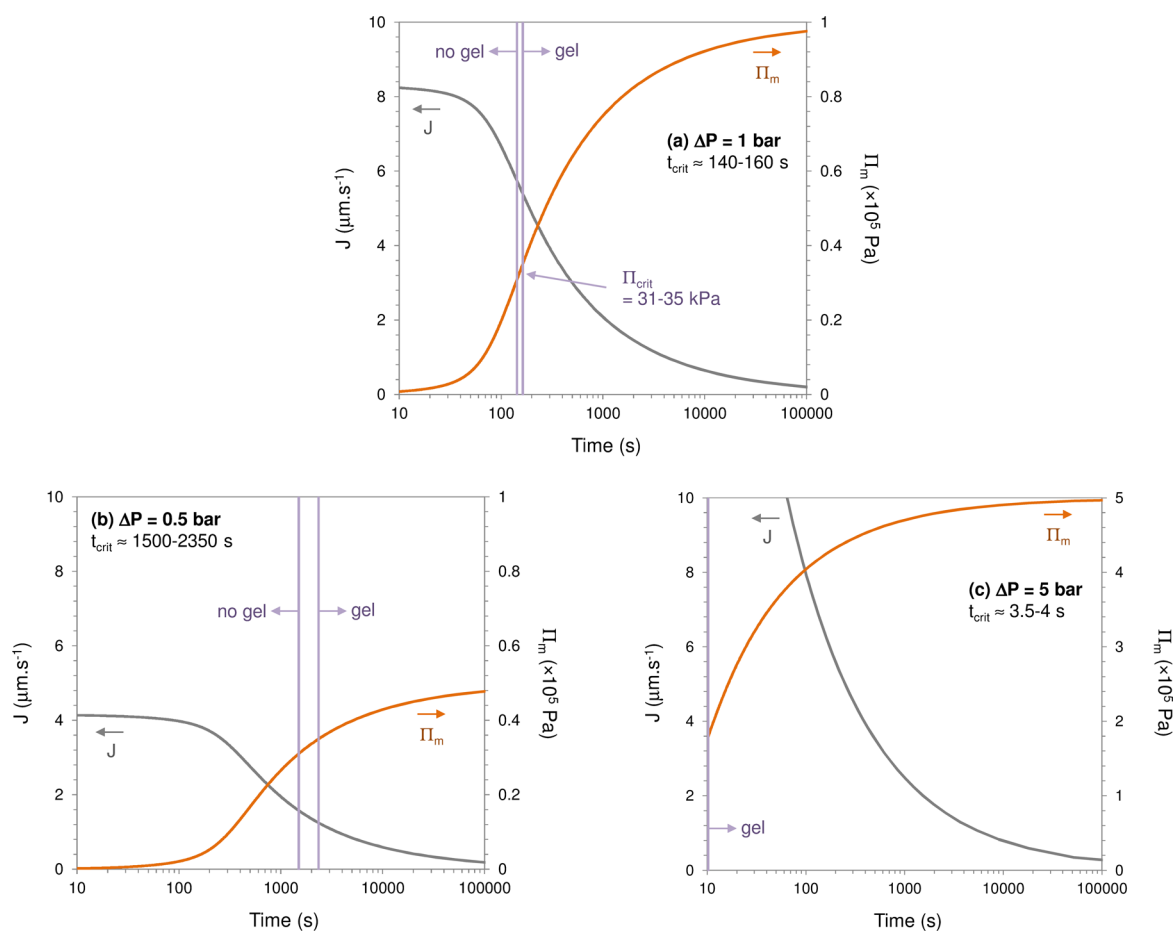


Figure 8. Using the model: time dependence of J and Π_m for "virtual" filtrations of a NPC dispersion. For all cases, the bulk casein concentration was set to $C_{\text{bulk}} = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the membrane resistance was set to $R_m = 1 \times 10^{13} \text{ m}^{-1}$. The three figures (a)–(c) correspond to three different transmembrane pressures. All calculations were made following the procedure of section 2.2, and assuming that Π and k evolve with C according to eqs 26 and 28, respectively. In all figures, the approximate time t_{crit} at which Π_m reaches the critical value for phase transition ($\Pi_{\text{crit}} = 31\text{--}35 \text{ kPa}$, see ref 40) is indicated with vertical full lines.

we were able to measure this pressure for NPC dispersions, and we found $\Pi_{\text{crit}} = 31\text{--}35\text{ kPa}$.⁴⁰ From that value, it is possible to evaluate the filtration time at which an irreversible deposit is formed at the membrane surface. Knowing this critical time t_{crit} is of crucial importance for whoever wants to avoid any severe fouling of the filtration installation and minimize cleaning costs.

Of course, and as illustrated in Figure 8, t_{crit} depends on the applied transmembrane pressure. At $\Delta P = 1\text{ bar}$ (Figure 8a), a deposit is formed after only 2 min of filtration. At $\Delta P = 5\text{ bar}$ (Figure 8c), the formation of the deposit is almost instantaneous with $t_{\text{crit}} = 3.5\text{--}4\text{ s}$ (!). At $\Delta P = 0.5\text{ bar}$ (Figure 8b), which seems to be a good compromise, the filtration can be conducted during 30 min before a gel is formed onto the membrane. Thus, by performing successive filtrations at $\Delta P = 0.5\text{ bar}$ and for less than 30 min, it is theoretically possible to conduct the filtration on an "infinite" time interval, without the annoying formation of an irreversible deposit at the membrane. The only constraint would be to "redisperse" the polarized layer between each run, by a simple agitation procedure, for instance (like in ref 40).

Figure 9 gives another illustration of how the filtration model can be used. For given conditions of filtration (taken as

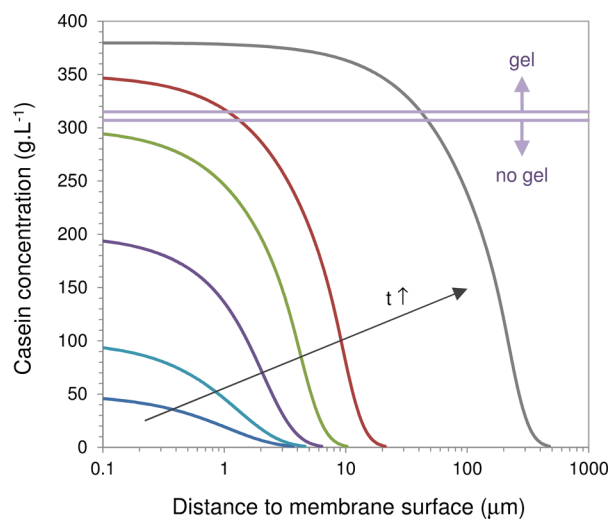


Figure 9. Modeling the casein concentration profile in the accumulated layer during a "virtual" filtration of a NPC dispersion. The case shown here corresponds to the conditions of Figure 8a: $C_{\text{bulk}} = 1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $R_m = 1 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$, $\Delta P = 1\text{ bar}$. Filtration times from bottom to top: 6 s, 14 s, 43 s, 128 s, 456 s, 2.3 d.

identical to those of Figure 8a in that case), it is indeed possible to calculate the casein concentration profile at the membrane surface for a given filtration time. In the conditions of Figure 9, we see that the thickness of the accumulated layer reaches about $10\text{ }\mu\text{m}$ at relatively short times (see the profile at $t = 128\text{ s}$). It takes more than 2 days for this layer to reach 0.5 mm in thickness. At this point, the gel is about $50\text{ }\mu\text{m}$ thick, which represents up to 10% of the total thickness of the accumulated layer.

In Figure 10, we finally compare the predictions of our model to the interesting results of David et al.⁶⁰ In contrast to the first modeling tests of Figure 5, the idea is now to directly confront our model to experimental data that it has never "seen" before. The study of David et al. is particularly suitable to that purpose because (i) they also investigate NPC dispersions of casein micelles, and (ii) their filtration results include filtration fluxes

and concentration profiles at the membrane surface, such measurements being made possible via combined filtration/SAXS experiments.

Figure 10a gives the prediction of flux versus time as compared to the data of David et al. The agreement is acceptable, with predicted fluxes that are in the same range as those measured during the filtration, particularly at intermediate times ($1000\text{--}10000\text{ s}$). Figure 10b gives the experimental and the predicted concentration profiles. Again, the agreement is acceptable, with predictions that do not exactly match the experimental concentrations, but which are clearly close to them.

In fact, several reasons could be responsible for the small—but existing—differences between our model and the experimental data of David et al. The principal are as follows: *Water instead of UF permeate:* David et al. prepared their dispersions by mixing the NPC powder with pure water instead of UF permeate. In such dispersions, the casein micelles have characteristics that are close to native, but with some minor changes in size ($\sim 5\%$) and mineral composition ($\sim 7\%$ in calcium and phosphate content).⁵⁴ It is imaginable that such changes have some effects on $\Pi(C)$ and $k(C)$, making eqs 26 and 28 not totally appropriate to this case.

A 100 kD membrane: All our filtration, osmotic stress, and osmometry experiments were performed with membranes of $\sim 10\text{ kD}$. Conversely, David et al. used a 100 kD membrane for their filtrations. In their case, it is probable that the 100 kD membrane does not retain some of the small species that are retained by the 10 kD filtration and dialysis membranes. Again, that would have a potential impact on the $\Pi(C)$ and $k(C)$ curves that need to be used for modeling the David's results, making eqs 26 and 28 not fully appropriate.

SAXS calibration: In the setup used by David et al., the casein concentration at the vicinity of the membrane is measured using an X-ray beam of $70\text{ }\mu\text{m}$ high (i.e., in the direction perpendicular to the membrane).⁶⁰ As a consequence, and despite all the precautions that the authors employ to calibrate the position of the beam relative to the membrane surface, we cannot exclude that an error of a few micrometers or even a few dozen micrometers exists between the positions given by the authors and the "exact" positions of the given concentration points. To illustrate the effect of such a small experimental error, we report in Figure 10c the experimental points of David et al. with a shift of $40\text{ }\mu\text{m}$ toward lower x values. In that case, one can see that the correspondence between the model and the experiment is very good.

Having listed all these points, it now seems clear that the "acceptable" agreement of Figures 10a and b is in fact extremely satisfactory. So it appears that the model (and its associated $\Pi(C)$ and $k(C)$ functions) is able to accurately predict the dead-end filtration of casein micelle dispersions in given conditions of transmembrane pressure and casein concentration.

If we now look at the casein micelle as a model object, such successful results make us confident that the modeling approach proposed here could be generalized to any "complicated" colloidal dispersion of soft and/or permeable and/or polydisperse objects.

5. CONCLUSION

Colloids have always been problematic objects in membrane filtration, essentially because their overconcentration at the membrane surface strongly impacts the performance of the

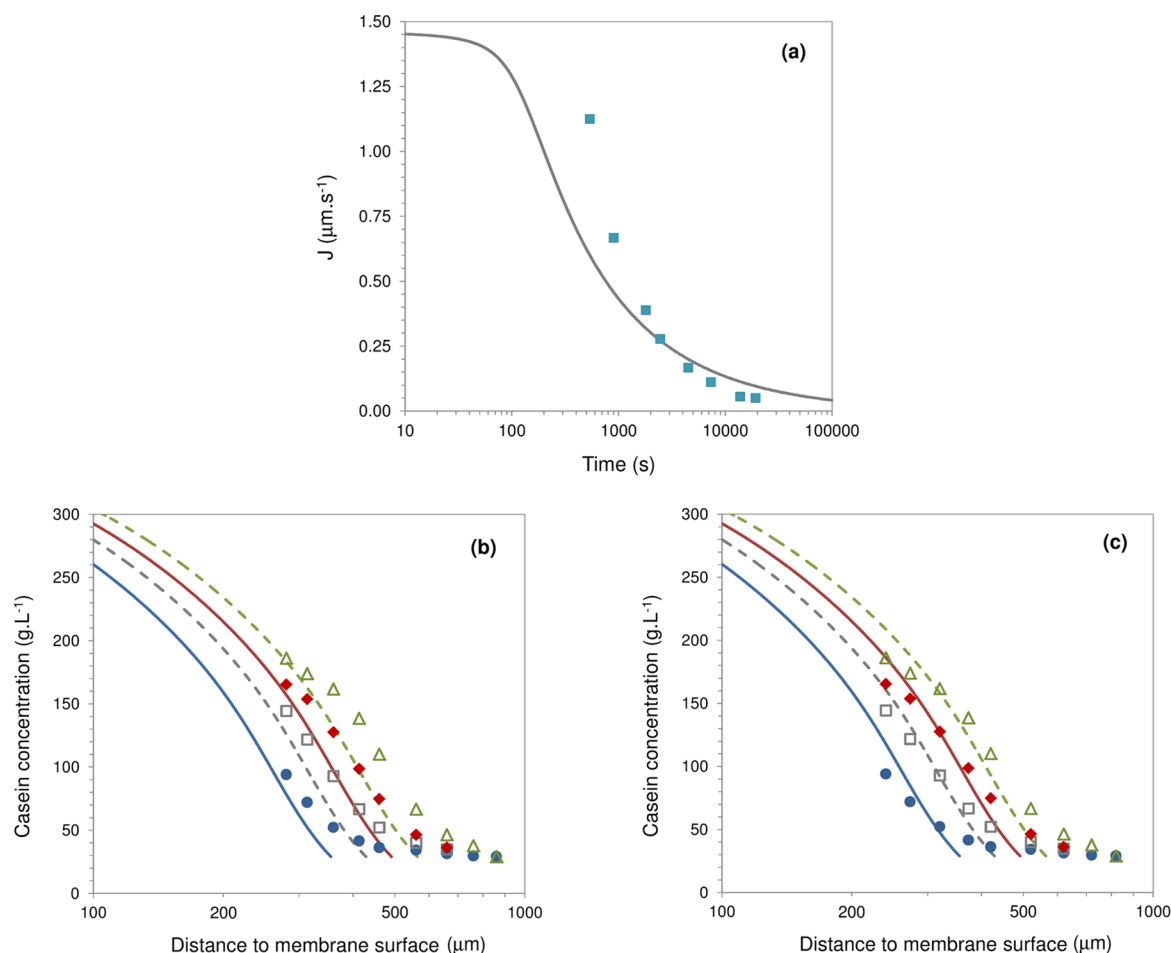


Figure 10. Comparing the model predictions with actual filtration results: filtration flux versus time (a), casein concentration profiles in the accumulated layer (b)–(c). The experimental results (symbols) are taken from the work of David et al.,⁶⁰ where a dispersion of NPC powder dispersed in water was filtered through a 100 kD ultrafiltration membrane at $\Delta P = 1.2$ bar. The full and dashed lines are the predictions obtained from the filtration model of section 2.2, assuming that Π and k evolve with C according to eqs 26 and 28. In (b) and (c), the filtration times from bottom to top are: 133, 188, 246, and 325 min. In (c), the experimental results are reported supposing that the distances given in the original David's paper are overestimated by $40\ \mu\text{m}$.

process.¹⁷ However, after some years of development, "colloidal" filtration models now exist.^{1,32} But still, they are limited to the ideal case of monodisperse hard-sphere colloids, which makes them impractical in the real world. In this paper, we treat the problem of soft and permeable colloids, with the objective of proposing a general approach for predicting the filtration of such objects.

For that purpose, and for a number of reasons that we give in the Introduction, we chose to base our study on the specific case of milk filtration, all experiments being performed with dispersions of milk casein micelles. Using this example, we develop the general idea that a filtration model can always be built for a given colloidal dispersion as long as this dispersion has been characterized in terms of osmotic pressure Π and hydraulic permeability k . Following what was already proposed for hard-sphere colloids, the filtration model can then be constructed knowing the evolution of Π and k with the colloid concentration.

For colloids that are soft, deformable, and permeable, the major issue is that the permeability of the dispersion cannot be assessed in a trivial way like in the case for hard-sphere colloids. To get around this difficulty, we followed two distinct approaches to actually measure the permeability k : a direct

approach, involving osmotic stress experiments, and a "reverse calculation" approach, consisting of estimating k through well-controlled filtration experiments.

The reported evolution of $k(C)$ is the first important result of this paper, as such experimental data have rarely been reported until now for such peculiar objects (in contrast to theoretical studies that are already available^{30,50}). We briefly discuss this evolution in light of our previous studies about the osmotic and phase properties of casein micelle dispersions.^{5,9,38} We also show that some questions remain, such as the exact effect of the presence of small impurities on k , or the potential physical basis of the observed similarities between the evolution of Π and k with C .

From the knowledge of $k(C)$, we then construct a filtration model and analyze it through a series of test and "virtual" experiments. We also directly compare the predictions of the model to filtration data obtained by other authors in combined filtration/SAXS experiments. In our opinion, the results of those calculations and comparisons are quite unequivocal and totally validate our methodology.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

A note on the equivalence between the modeling approach proposed in this paper and the well-known convection–diffusion equation in the case of a dispersion of monodisperse hard sphere colloids. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: Antoine.Bouchoux@insa-toulouse.fr.

Present Address

[†]Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés / LISBP, UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSAT, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 04, France.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support provided by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Région Bretagne.

■ REFERENCES

- (1) Bowen, W. R.; Williams, P. M. Quantitative predictive modelling of ultrafiltration processes: Colloidal science approaches. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *134–135*, 3–14.
- (2) Tan, B. H.; Tam, K. C. Review on the dynamics and microstructure of pH-responsive nano-colloidal systems. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2008**, *136*, 25–44.
- (3) Mattsson, J.; Wyss, H. M.; Fernandez-Nieves, A.; Miyazaki, K.; Hu, Z.; Reichman, D. R.; Weitz, D. A. Soft colloids make strong glasses. *Nature* **2009**, *462*, 83–86.
- (4) Dagleish, D. G. On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements. *Soft Matter* **2011**, *7*, 2265–2272.
- (5) Bouchoux, A.; Gésan-Guiziou, G.; Pérez, J.; Cabane, B. How to squeeze a sponge: casein micelles under osmotic stress, a SAXS study. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 3754–3762.
- (6) De Kruif, C. G. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 3019–3028.
- (7) Ouanezar, M.; Guyomarc'h, F.; Bouchoux, A. AFM imaging of milk casein micelles: Evidence for structural rearrangement upon acidification. *Langmuir* **2012**, *28*, 4915–4919.
- (8) Dagleish, D. G.; Corredig, M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2012**, *3*, 449–467.
- (9) Bouchoux, A.; Cayemite, P. E.; Jardin, J.; Gésan-Guiziou, G.; Cabane, B. Casein micelle dispersions under osmotic stress. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 693–706.
- (10) Gebhardt, R.; Vendrely, C.; Kulozik, U. Structural characterization of casein micelles: shape changes during film formation. *J. Phys.: Condens. Matter* **2011**, *23*, 444201.
- (11) Maubois, J. L.; Ollivier, G. In *Foods proteins and their applications*; Damodaran, S., Paraf, A., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1997; pp 579–595.
- (12) Brans, G.; Schroen, C. G. P. H.; Van Der Sman, R. G. M.; Boom, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Membr. Sci.* **2004**, *243*, 263–272.
- (13) Jimenez-Lopez, A. J. E.; Leconte, N.; Garnier-Lambrouin, F.; Bouchoux, A.; Rousseau, F.; Gésan-Guiziou, G. Ionic strength dependence of skimmed milk microfiltration: Relations between filtration performance, deposit layer characteristics and colloidal properties of casein micelles. *J. Membr. Sci.* **2011**, *369*, 404–413.
- (14) Cohen, R. D.; Probstein, R. F. Colloidal fouling of reverse osmosis membranes. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *114*, 194–207.
- (15) Belfort, G.; Davis, R. H.; Zydney, A. L. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *J. Membr. Sci.* **1994**, *96*, 1–58.
- (16) Bowen, W. R.; Jenner, F. Dynamic ultrafiltration model for charged colloidal dispersions: A Wigner-Seitz cell approach. *Chem. Eng. Sci.* **1995**, *50*, 1707–1736.
- (17) Bacchin, P.; Aimar, P.; Field, R. W. Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. *J. Membr. Sci.* **2006**, *281*, 42–69.
- (18) Chen, J. C.; Elimelech, M.; Kim, A. S. Monte Carlo simulation of colloidal membrane filtration: Model development with application to characterization of colloid phase transition. *J. Membr. Sci.* **2005**, *255*, 291–305.
- (19) Elimelech, M.; Bhattacharjee, S. A novel approach for modeling concentration polarization in crossflow membrane filtration based on the equivalence of osmotic pressure model and filtration theory. *J. Membr. Sci.* **1998**, *145*, 223–241.
- (20) Tang, C. Y.; Chong, T. H.; Fane, A. G. Colloidal interactions and fouling of NF and RO membranes: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *164*, 126–143.
- (21) Kim, S.; Marion, M.; Jeong, B. H.; Hoek, E. M. V. Crossflow membrane filtration of interacting nanoparticle suspensions. *J. Membr. Sci.* **2006**, *284*, 361–372.
- (22) Vollebregt, H. M.; Van Der Sman, R. G. M.; Boom, R. M. Suspension flow modelling in particle migration and microfiltration. *Soft Matter* **2010**, *6*, 6052–6064.
- (23) Bacchin, P.; Meireles, M.; Aimar, P. Modelling of filtration: from the polarised layer to deposit formation and compaction. *Desalination* **2002**, *145*, 139–146.
- (24) Bowen, W. R.; Mongruel, A.; Williams, P. M. Prediction of the rate of crossflow membrane ultrafiltration: a colloidal interaction approach. *Chem. Eng. Sci.* **1996**, *51*, 4321–4333.
- (25) Bonnet-Gonnat, C.; Belloni, L.; Cabane, B. Osmotic pressure of latex dispersion. *Langmuir* **1994**, *10*, 4012–4021.
- (26) Carrière, D.; Page, M.; Dubois, M.; Zemb, T.; Colfen, H.; Meister, A.; Belloni, L.; Schonhoff, M.; Mohwald, H. Osmotic pressure in colloid science: clay dispersions, catanionics, polyelectrolyte complexes and polyelectrolyte multilayers. *Colloids Surf., A* **2007**, *303*, 137–143.
- (27) Jönsson, B.; Persello, J.; Li, J.; Cabane, B. Equation of State of Colloidal Dispersions. *Langmuir* **2011**, *27*, 6606–6614.
- (28) Menut, P.; Seiffert, S.; Sprakel, J.; Weitz, D. A. Does size matter? Elasticity of compressed suspensions of colloidal- and granular-scale microgels. *Soft Matter* **2012**, *8*, 156–164.
- (29) Carman, P. C. Fluid flow through granular beds. *Chem. Eng. Res. Des.* **1997**, *75*, S32–S48.
- (30) Deo, S.; Filippov, A.; Tiwari, A.; Vasin, S.; Starov, V. Hydrodynamic permeability of aggregates of porous particles with an impermeable core. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *164*, 21–37.
- (31) Petsev, D. N.; Starov, V. M.; Ivanov, I. B. Concentrated dispersions of charged colloidal particles: Sedimentation, ultrafiltration and diffusion. *Colloids Surf., A* **1993**, *81*, 65–81.
- (32) Bacchin, P.; Si-Hassen, D.; Starov, V.; Clifton, M. J.; Aimar, P. A unifying model for concentration polarization, gel-layer formation and particle deposition in cross-flow membrane filtration of colloidal suspensions. *Chem. Eng. Sci.* **2002**, *57*, 77–91.
- (33) Merlin, A.; Salmon, J. B.; Leng, J. Microfluidic-assisted growth of colloidal crystals. *Soft Matter* **2012**, *8*, 3526–3537.
- (34) Bacchin, P.; Espinasse, B.; Bessière, Y.; Fletcher, D. F.; Aimar, P. Numerical simulation of colloidal dispersion filtration: description of critical flux and comparison with experimental results. *Desalination* **2006**, *192*, 74–81.
- (35) Bessiere, Y.; Fletcher, D. F.; Bacchin, P. Numerical simulation of colloid dead-end filtration: Effect of membrane characteristics and operating conditions on matter accumulation. *J. Membr. Sci.* **2008**, *313*, 52–59.
- (36) Happel, J. Viscous flow in multiparticle systems: Slow motion of fluids relative to beds of spherical particles. *AIChE J.* **1958**, *4*, 197–201.

- (37) Bowen, W. R.; Williams, P. M. Obtaining the osmotic pressure of electrostatically stabilized colloidal dispersions from frontal ultrafiltration experiments. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *233*, 159–163.
- (38) Bouchoux, A.; Debbou, B.; Gesan-Guiziou, G.; Famelart, M. H.; Doublier, J. L.; Cabane, B. Rheology and phase behavior of dense casein micelle dispersions. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 165106–165111.
- (39) Nair, P. K.; Dagleish, D. G.; Corredig, M. Colloidal properties of concentrated heated milk. *Soft Matter* **2013**, *9*, 3815–3824.
- (40) Qu, P.; Gesan-Guiziou, G.; Bouchoux, A. Dead-end filtration of sponge-like colloids: The case of casein micelle. *J. Membr. Sci.* **2012**, *417–418*, 10–19.
- (41) Wijmans, J. G.; Nakao, S.; Van Den Berg, J. W. A.; Troelstra, F. R.; Smolders, C. A. Hydrodynamic resistance of concentration polarization boundary layers in ultrafiltration. *J. Membr. Sci.* **1985**, *22*, 117–135.
- (42) Tiller, F. M.; Kwon, J. H. Role of porosity in filtration: XIII. Behavior of highly compactible cakes. *AIChE J.* **1998**, *44*, 2159–2167.
- (43) Sherwood, J. D. Initial and final stages of compressible filtercake compaction. *AIChE J.* **1997**, *43*, 1488–1493.
- (44) Lee, D. J.; Wang, C. H. Theories of cake filtration and consolidation and implications to sludge dewatering. *Water Res.* **2000**, *34*, 1–20.
- (45) Rubinstein, M.; Colby, R. H.; Dobrynin, A. V.; Joanny, J. F. Elastic modulus and equilibrium swelling of polyelectrolyte gels. *Macromolecules* **1996**, *29*, 398–406.
- (46) Style, R. W.; Peppin, S. S. L. Crust formation in drying colloidal suspensions. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **2011**, *467*, 174–193.
- (47) Bowen, W. R.; Jenner, F. Electroviscous effects in charged capillaries. *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *173*, 388–395.
- (48) Bowen, W. R.; Williams, P. M. The osmotic pressure of electrostatically stabilized colloidal dispersions. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *184*, 241–250.
- (49) Parsegian, V. A.; Rand, R. P.; Fuller, N. L.; Rau, D. C. Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces. *Method. Enzymol.* **1986**, *127*, 400–416.
- (50) Abade, G. C.; Cichocki, B.; Ekiel-Jezewska, M. L.; Nagele, G.; Wajnryb, E. Diffusion, sedimentation, and rheology of concentrated suspensions of core-shell particles. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 104902–104916.
- (51) Schuck, P.; Piot, M.; Méjean, S.; Le Graët, Y.; Fauquant, J.; Brulé, G.; Maubois, J. L. Spray-drying of native phosphocaseinate obtained by membrane microfiltration. *Lait* **1994**, *74*, 375–388.
- (52) Jenness, R.; Koops, J. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.* **1962**, *16*, 153–164.
- (53) Gaiani, C.; Scher, J.; Schuck, P.; Hardy, J.; Desobry, S.; Banon, S. The dissolution behavior of native phosphocaseinate as a function of concentration and temperature using a rheological approach. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1427–1434.
- (54) Famelart, M. H.; Lepesant, F.; Gaucheron, F.; Le Graet, Y.; Schuck, P. pH-induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: influence of aqueous phase. *Lait* **1996**, *76*, 445–460.
- (55) Moitzi, C.; Menzel, A.; Schurtenberger, P.; Stradner, A. The pH induced sol-gel transition in skim milk revisited. A detailed study using time-resolved light and X-ray scattering experiments. *Langmuir* **2011**, *27*, 2195–2203.
- (56) Tuinier, R.; De Kruif, C. G. Stability of casein micelles in milk. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 1290–1295.
- (57) http://lpsb.nichd.nih.gov/osmotic_stress.htm, Accessed July 2013.
- (58) Dahbi, L.; Alexander, M.; Trappe, V.; Dhont, J. K. G.; Schurtenberger, P. Rheology and structural arrest of casein suspensions. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *342*, 564–570.
- (59) Li, Y.; Park, C. W. Permeability of packed beds filled with polydisperse spherical particles. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1998**, *37*, 2005–2011.
- (60) David, C.; Pignon, F.; Narayanan, T.; Sztucki, M.; Gesan-Guiziou, G.; Magnin, A. Spatial and temporal in situ evolution of the concentration profile during casein micelle ultrafiltration probed by small-angle X-ray scattering. *Langmuir* **2008**, *24*, 4523–4529.

A general approach for predicting the filtration of soft and permeable colloids: the Milk example

Antoine Bouchoux,^{†,‡,*} Peng Qu,^{†,‡} Patrice Bacchin,^{§,||} Geneviève Gésan-Guizieu^{†,‡}

[†] INRA, UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

[‡] AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 STLO, F-35042 Rennes, France

[§] Université de Toulouse, INPT, UPS, Laboratoire de Génie Chimique, 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

^{||} CNRS, UMR 5503, F-31062 Toulouse, France

On the equivalence between the generalized Darcy's law and the convection-diffusion equation for dispersions of monodisperse hard sphere colloids.

In the article, we suggest that a unique relationship can possibly be used for the purpose of modeling the filtration of a colloidal dispersion. This relationship is equivalent to the "classical" Darcy's law, but applied in all positions x of the layer of colloids accumulated at the membrane surface (polarized layer + gel). In addition, and as discussed in the manuscript, the gradient of osmotic pressure Π throughout the accumulated layer can be used for the driving force for permeation.¹⁻³ In final, this equation is:

$$J = -\frac{k(C)}{\eta} \cdot \frac{d\Pi(C)}{dx} \quad (\text{S-1})$$

where $k(C)$ is the permeability at position x of the colloidal accumulated layer, and η the viscosity of the fluid that passes through it.

As we mention in the article, such a generic description has already been used for modeling the filtration of hard sphere colloids.^{1,2,4,5} In this very special case, it is interesting to note that eq S-1 is in fact strictly equivalent to the "classical" convection-diffusion equation that is commonly used in the membrane community for describing the concentration polarization phenomenon. This is the purpose of this brief Supplementary Information.

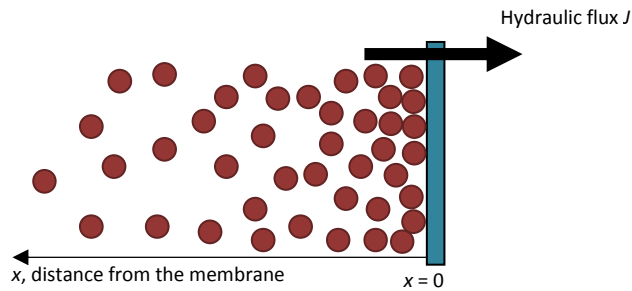


Figure S1. Monodisperse colloidal hard-spheres accumulating at the surface of a filtration membrane.

Figure S1 depicts the specific situation of hard and monodisperse spheres forming a concentration polarization layer at the surface of a membrane. At steady state, and at any x-point of this layer, there is a strict equilibrium between the net convective flux of the colloids (which obviously occurs towards the membrane) and the net back diffusion flux (which occurs in the opposite direction due to the gradient of colloid concentration). This writes, with the convention of Figure S1:

$$J \cdot C + D(C) \cdot \frac{dC}{dx} = 0 \quad (\text{S-2})$$

where $D(C)$ is the collective- or gradient-diffusion coefficient of the colloids.

The use of this peculiar form of the diffusion constant is strictly mandatory for colloids if one wants to accurately describe the system.^{6,7} $D(C)$ differs from the self-diffusion constant in that it describes the macroscopic flux of the particles in the presence of a gradient in concentration. $D(C)$ depends both on structural (S) and hydrodynamics effects (H), so that $\frac{D(C)}{D_0} \approx \frac{H(C)}{S(C)}$, with D_0 the Stokes-Einstein self-

diffusion constant for an isolated sphere of radius r_p , $D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_p}$. The structural effects $S(C)$ are given by

the osmotic compressibility of the system $d\Pi(C)/dC$. On the other hand, the hydrodynamic effects $H(C)$ are directly related to the mean hindered sedimentation velocity of the involved colloids, which is usually expressed through a sedimentation coefficient $K(C)$. The resulting expression for $D(C)$ is the generalized Stokes-Einstein equation:^{8,9}

$$\frac{D(C)}{D_0} = \frac{V_p}{kT} \cdot \frac{K(C)}{v} \cdot \frac{d\Pi(C)}{dC} \quad (\text{S-3})$$

where V_p is the volume of the particle and v its voluminosity, i.e., the volume occupied by the particles per gram of colloidal matter in the dispersion.

We then can use the following relationship between $K(C)$ and the permeability $k(C)$, which was originally proposed by Zick and Homsy for a slow flow through a periodic array of monodisperse non-porous spheres:

$$K(C) = \frac{9}{2} \frac{vC}{r_p^2} k(C) \quad (\text{S-4})$$

Combining these last three equations, we then simply obtain eq S-1. We conclude that the two approaches (eqs S-1 and S-2) are equivalent for treating the "simple" problem of the filtration of monodisperse hard-sphere colloids. For more difficult cases, like the one treated in the article (deformable, polydisperse, and porous colloids that form a cake at close packing), eq S-2 cannot be used anymore. On the other hand, eq S-1 is always valid, and relies on parameters ($\Pi(C)$ and $k(C)$) that can be measured and/or estimated in all cases.

References

- 1 M. Elimelech, S. Bhattacharjee, *J. Membr. Sci.*, 2002, **145**, 139.
- 2 W.R. Bowen, F. Jenner, *Chem. Eng. Sci.*, 1995, **50**, 1707.
- 3 J.D. Sherwood, *AIChE J.*, 1997, **43**, 1488.

- 4 P. Bacchin, A. Marty, P. Duru, M. Meireles and P. Aimar, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2011, **164**, 2.
- 5 P. Bacchin, B. Espinasse, Y. Bessière, D.F. Fletcher and P. Aimar, *Desalination*, 2006, **192**, 74.
- 6 A.M. Leshansky, J.F. Morris and J.F. Brady, *J. Fluid Mech.*, 2008, **597**, 305.
- 7 W.B. Russel, D.A. Saville, and W.R. Schowalter, *Colloidal Dispersions*, Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
- 8 W.R. Bowen, A. Mongruel, *Colloids Surf. , A*, 1998, **138**, 161.
- 9 C. Van den Broeck, F. Lostak and H.N.W. Lekkerkerker, *J. Chem. Phys.*, 1981, **74**, 2006.

Annexe C-5

Pasquier et al., Physical Chemistry Chemical Physics, 2015



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,
2016, **18**, 28458

Osmotic pressures of lysozyme solutions from gas-like to crystal states†

Coralie Pasquier,^{ab} Sylvie Beaufile, ^b Antoine Bouchoux,^{ac} Sophie Rigault,^a
Bernard Cabane,^d Mikael Lund,^e Valérie Lechevalier,^a Cécile Le Floch-Fouéré,^a
Maryvonne Pasco,^a Gilles Pabœuf,^b Javier Pérez^f and Stéphane Pezennec^{*a}

We obtained osmotic pressure data of lysozyme solutions, describing their physical states over a wide concentration range, using osmotic stress for pressures between 0.05 bar and about 40 bar and volume fractions between 0.01 and 0.61. The osmotic pressure vs. volume fraction data consist of a dilute, gas-phase regime, a transition regime with a high-compressibility plateau, and a concentrated regime where the system is nearly incompressible. The first two regimes are shifted towards a higher protein volume fraction upon decreasing the strength or the range of electrostatic interactions. We describe this shift and the overall shape of the experimental data in these two regimes through a model accounting for a steric repulsion, a short-range van der Waals attraction and a screened electrostatic repulsion. The transition is caused by crystallization, as shown by small-angle X-ray scattering. We verified that our data points correspond to thermodynamic equilibria, and thus that they consist of the reference experimental counterpart of a thermodynamic equation of state.

Received 3rd June 2016,
Accepted 16th September 2016

DOI: 10.1039/c6cp03867k

www.rsc.org/pccp

1 Introduction

Knowledge about the interactions in very concentrated solutions of proteins, namely up to a few hundred grams per liter, is of high relevance in various fields, such as the living cell physiology, food transformation (foams, powders, membrane filtration...), pharmacology and drug delivery, or diseases implying the phase transition of proteins.^{1–7} Predictive models, relying mostly on the knowledge gained from colloidal physics, have been proposed for the behavior of concentrated proteins.^{8–10} However, they fail to determine the complexity and the variability of the protein molecules, related to

the combination of their different levels of structures with the distinct physicochemical properties of amino acid residues.

Osmotic pressure measurements enable us to probe protein–protein, protein–ion or protein–solvent interactions. Data on globular proteins have been established in the past,^{11–14} however the highest concentrations that were obtained were never high enough to enable the system to go out of a dilute or semi-dilute range. In this work we report results obtained through osmotic stress^{15–23} as a concentration technique. This method makes it possible to control the osmotic pressure over a wide range of volume fractions (spanning from the dilute phase to phases where interactions play a prominent role, up to the solid phase) and to reach the same concentration state by different pathways, while keeping constant the salt activity.

We study lysozyme, a globular protein, that has been well characterized since its discovery in 1922. Numerous studies have been conducted on lysozyme, in particular its self-interaction characteristics when concentrated or subjected to changes in the physicochemical conditions.^{9,24–35} Specifically, lysozyme has been shown, as other non-protein colloids, to exhibit a combination of long-range repulsive and short-range attractive interactions, which leads to the formation of equilibrium clusters.^{24,25}

In the present work, we aim to bring answers to the following questions:

- Do the diagrams relating osmotic pressure Π to volume fraction ϕ enable us to identify transitions of the system when concentration is increased?
- If we tune the interactions, do the diagrams reflect the changes? Is it in a predictable way?

^a STLO, Agrocampus Ouest, INRA, 35000, Rennes, France.

E-mail: stephane.pezennec@inra.fr

^b Institut de Physique de Rennes, UMR6251 CNRS-Université de Rennes 1,
F-35042 Rennes, France

^c LISBP, UMR 5504/792 INRA-CNRS-INSA, 135 avenue de Rangueil,
F-31077 Toulouse CEDEX 04, France

^d Laboratoire CBI, CNRS UMR 8231, Université Pierre et Marie Curie,
Université Diderot, ESPCI, 10 rue Vauquelin, F-75231, Paris CEDEX 05, France

^e Department of Theoretical Chemistry, Lund University, P.O. Box 124,
SE-22100 Lund, Sweden

^f Synchrotron SOLEIL, F-91192 Gif-sur-Yvette, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Net charge of lysozyme as a function of pH (Fig. S1); reversibility of osmotic stress at 150 mM and 35 mM ionic strengths (Fig. S2 and S3); Fourier transform infrared spectra and secondary structure of lysozyme, experimental procedure and results (Fig. S4); small-angle X-ray scattering, experimental procedure and results (Fig. S5); generalized van der Waals (GVDW) model; fitting of the GVDW model with and without screening of electrostatic interactions by counterions (Fig. S6); impact of the value of the radius of the lysozyme model on the osmotic pressure predicted by the GVDW model (Fig. S7); references. See DOI: 10.1039/c6cp03867k

- What are the positions of the (ϕ, Π) lines with respect to theoretical models for simple colloids?
- Are the (ϕ, Π) diagrams that we obtain for lysozyme the experimental reference for true equations of state (EOS)?

2 Materials and methods

Sample preparation

Lysozyme hydrochloride powder (lysozyme purity higher than 98%, as determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC)) was a gift from LIOT (Annezin, France). Stock solutions were prepared by solubilizing protein in 18 MΩ resistivity Milli-Q water (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and were kept at 4 °C.

Osmotic stress technique

The osmotic stress experiments were performed according to the procedure described by Bouchoux *et al.*²⁰ The osmotic stress technique is based on osmosis: the disequilibrium of chemical potentials between the interior of the dialysis bag, containing the protein solution, and the surrounding medium of controlled osmotic pressure causes a water flow from the high to the low chemical potential compartments. When the high chemical potential side is the protein solution, the latter is concentrated until equilibrium is reached.

We used four types of bis-tris propane-HCl buffers: pH 7 and 20 mM, 35 mM, and 150 mM ionic strength, and pH 9 and 20 mM ionic strength. Lysozyme net charges of +8.3 *e* and +6.3 *e* at pH 7 and pH 9, respectively, were predicted from its three-dimensional structure (PDB ID: 2VB1³⁶) using PROPKA^{37,38} (see also Fig. S1, ESI†). Each buffer contained 0.2 g L⁻¹ of thimerosal (Sigma, Saint Louis, USA) in order to avoid bacterial development. The bis-tris propane total concentration was chosen to account for an ionic strength of 20 mM, depending on the pH: 11.3 mM at pH 7 and 40 mM at pH 9. Ionic strengths of 35 mM and 150 mM were obtained by adding NaCl. Thimerosal, bis-tris propane (1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane) and NaCl were bought from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA).

Polymer solutions were prepared directly in 500 mL glass bottles, by mixing the desired amount of polyethylene glycol (PEG) 20 000 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and buffer at 20 °C. To relate PEG 20 000 concentrations and osmotic pressures, we used the single-parameter phenomenological equation of state of PEG established by Cohen *et al.*,³⁹ assuming a prefactor $\alpha = 0.44$, a monomer mass $M_m = 44$ Da and a specific partial volume $\bar{V} = 0.825$ mL g⁻¹ for PEG 20 000:

$$\Pi N^{9/5} = \frac{RT}{M_m \bar{V}} \left(\frac{C}{C_N^*} + \alpha \left(\frac{C}{C_N^*} \right)^{9/4} \right) \quad (1)$$

where N is the number of monomers per PEG molecule. The concentration C_N^* is defined by:

$$C_N^* = \frac{N^{-4/5}}{\bar{V}} \quad (2)$$

Polymer solutions were kept at 20 °C during the whole experiments.

We used a SpectraPor Dialysis Membrane, with a 6–8 kDa molecular mass cutoff and a 6.4 mm diameter (SpectrumLabs, Rancho Dominguez, USA) for the dialysis bags. Such a mass cutoff allows free exchange of ions and water, but not that of proteins and PEG 20 000. For each bag, a 10 cm length of dialysis membrane was cut and rinsed in Milli Q water. The bag was then filled with a protein stock solution of low concentration (50 g L⁻¹ for osmotic pressures higher than 0.39 bar, and 10 g L⁻¹ for pressures of 0.05 bar and 0.12 bar) and immersed in the polymer solution.

Due to the water efflux, the volume of the dialysis bags decreased. Dialysis bags were frequently taken out of the polymer solution, rinsed carefully with deionized water in order to avoid contamination of the protein solution with PEG 20 000, then opened and re-filled with the low-concentration protein solution. The already stressed, concentrated solution and the new, dilute one were then homogenized, and the bag was put back in the polymer solution.

As the increase in the concentration of the solution inside the bags can be very important, especially for solutions subject to high osmotic pressures, the solutions subject to pressures higher than 1.16 bar were first equilibrated to 1.16 bar for one week. The solutions subject to pressures lower than 1.16 bar were directly put to their final osmotic pressure. After one week, all the bags were transferred into new polymer solutions, of their final osmotic pressure. They were kept in these solutions for two weeks, during which they were frequently re-filled, in order to obtain a weight of protein solution that was sufficient to make a dry content analysis (more than 1 g). At the end of the two weeks, the bags were considered of sufficient volume and were no more re-filled. However, during the two weeks, some water flowed out of the bags and diluted the polymer solution, which decreased slightly the external osmotic pressure. Thus, the bags were finally transferred into new polymer solutions of the desired osmotic pressure, and kept without re-filling for one more week. At the end of these four weeks, the protein solution was considered to be in equilibrium with the surrounding polymer solution.

For decompression experiments, the protein solution was first equilibrated at the desired final osmotic pressure following the procedure described above. Then, the dialysis bag was put in a polymer solution of higher osmotic pressure for a week, without re-filling it. Finally, the bag was put back in a polymer solution inducing the same osmotic pressure as that applied initially. In the following, we shall refer to this compression–decompression cycle as “two-way compression”.

Dry content measurement

This technique was used to determine the concentration of protein in the concentrated solutions obtained using osmotic pressure.

We used stainless steel cupels (diameter 60 mm, height 25 mm), with a removable lid. In each cupel, we put 25 g of Fontainebleau sand. The cupels and small glass rods were kept in an oven at 102 °C for a minimum period of 2 h, with the lid open, in order to eliminate remaining water. The cupels and

rods were then left to cool at room temperature in a desiccator containing recently dehydrated silica gel, under vacuum, for a minimum period of 45 min.

After cooling, each cupel was weighed (precision of 0.1 mg) with its lid closed and a glass rod. Each bag was rinsed, and then opened and the protein solution was quickly put in a cupel. The total (cupel, lid, sample and glass rod) was then weighed. The sample was mixed with the Fontainebleau sand with the glass rod, which was left inside the cupel. The cupel (lid open) was then put in an oven at 102 °C overnight.

The day after, each cupel with its glass rod (lid closed) was left to cool at room temperature in a desiccator containing recently dehydrated silica gel for minimum 45 min. After cooling, each cupel was weighed (precision of 0.1 mg) with its lid closed.

Dry content weights were corrected for sodium chloride and bis-tris propane weights. Conversion from weights to volume fractions was performed considering that lysozyme had a specific partial volume of 0.712 mL g⁻¹.⁴⁰

Dynamic vapor sorption (DVS)

Desorption isotherms of a 50 g L⁻¹ lysozyme solution were obtained using a dynamic vapor sorption analyzer DVS (Surface Measurement Systems Ltd, London, UK) equipped with a Cahn microbalance. The experiments were carried out at constant temperature (20 °C) and relative humidity values of 5%, 60% and 90%, to reach water activity values of 0.05 and 0.6 and 0.9, respectively, at the equilibrium.

The water activity was converted to osmotic pressure using the formula:

$$\Pi = -\frac{RT}{v_a} \ln(a_w) \quad (3)$$

with Π being the osmotic pressure (in Pa), R the universal gas constant, T the temperature, v_a the molar volume of water and a_w the water activity.

3 Results

3.1 Osmotic pressure profiles of lysozyme in a pH 7, $I = 20$ mM buffer

Fig. 1 presents the measured values of the protein volume fraction (horizontal axis) according to the osmotic pressures applied to the solution of lysozyme in a buffer at pH 7 and ionic strength 20 mM. Under these conditions the net charge per protein is +8.3 e (see Materials and methods). For comparison, we plotted the van't Hoff law of ideal gases, $\Pi = \rho k_B T$, where ρ is the number density and k_B the Boltzmann constant, and the Carnahan–Starling EOS⁴¹ $\Pi = \rho k_B T \frac{1 + \phi + \phi^2 - \phi^3}{(1 - \phi)^3}$, where ϕ is the volume fraction, which describes a hard sphere gas,¹⁵ using the lysozyme molecular weight (14 313 Da)⁴² and the partial specific volume (0.712 mL g⁻¹)⁴⁰ so that the volume and the mass of the equivalent spheres are equal to those of the proteins. The radius of the equivalent spheres is 1.59 nm.

The data demonstrate that osmotic stress makes it possible to cover three decades in osmotic pressures and two decades in

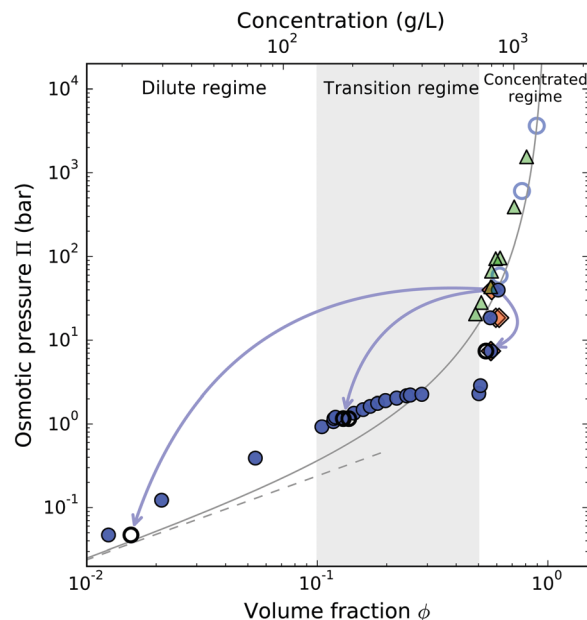


Fig. 1 (ϕ, Π) diagram of lysozyme in a pH 7, $I = 20$ mM bis-tris propane buffer, obtained by one-way compression (filled blue circles), or by compression to 39.75 bar followed by decompression to different pressures ("two-way compression", empty black circles): the arrows symbolize the decompression part of the two-way compression experiments. The solid line represents the Carnahan–Starling model and the dashed black line represents the van't Hoff model. Data from the study of Rickard *et al.*²⁹ obtained by bulk vapor desorption are represented by green triangles. Our data from dynamic vapor sorption (DVS, empty blue circles) were obtained using lysozyme solutions initially at pH 7 and 35 mM ionic strength, but DVS does not keep concentrations constant. Crystal densities extracted from SAXS data (see discussion, Section 4.2) are represented by orange diamonds.

volume fractions. At very high pressures, our data for pH 7 and ionic strength 35 mM match the results obtained by Rickard *et al.* through single particle sorption²⁹ and our own dynamic vapor sorption (DVS) results. It is noteworthy that, in contrast to osmotic stress, DVS and Rickard's microparticle technique concentrate all solutes, including salts, so that the ionic strength may vary.

The osmotic pressure profile can be divided into three parts: a dilute regime, up to $\phi = 0.1$; a transition regime, ranging from $\phi = 0.1$ to 0.5, where the slope of the curve decreases until a plateau, characterized experimentally by a large step in volume fraction (almost two-fold increase); then a concentrated regime, above $\phi = 0.5$, where the pressure increases steeply with volume fraction.

The use of the van't Hoff and Carnahan–Starling models is generally restricted to fluid, dilute systems.⁴³ In our case, in the dilute regime, the pressures of the lysozyme solutions are approximately twice as large as the Carnahan–Starling model or a van't Hoff perfect gas system. In the discussion, Section 4, we shall present a model that explains the origin of this excess pressure.

3.2 Morphology of lysozyme solutions in a pH 7, $I = 20$ mM buffer

The pictures shown in Fig. 2 have been chosen to illustrate the changes in the morphology of the lysozyme solution (pH 7, $I = 20$ mM buffer) subjected to different osmotic pressures.

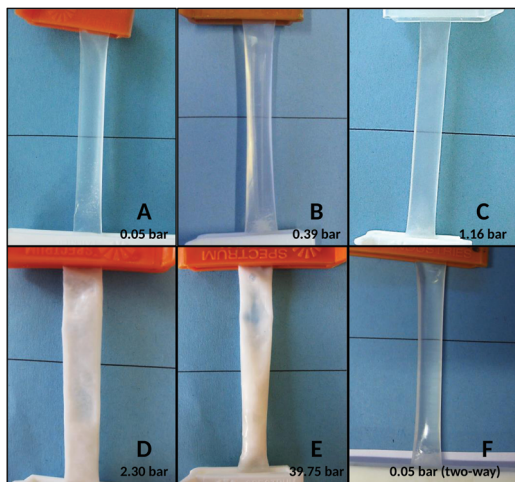


Fig. 2 Photographs of dialysis bags containing lysozyme at pH 7 and 20 mM ionic strength, subjected to different osmotic pressures: 0.05 bar (A), 0.39 bar (B), 1.16 bar (C), 2.30 bar (D) and 39.75 bar (E). Photograph (F) shows the bag after compressing the solution from 0.05 to 39.75 bar, and then decompressing it back to 0.05 bar.

The 10 g L^{-1} and 50 g L^{-1} ($\phi = 0.0071$ and 0.0356 , respectively) stock solutions are clear, transparent liquids that flow easily. Samples obtained by osmotic compression have the same aspect as the stock solutions from 0.05 bar (Fig. 2A) to 0.12 bar. When the solutions are concentrated further, they become increasingly dense but remain transparent, with some white, fluffy aggregates visible at the bottom of the bag (Fig. 2B and C). For pressures above 2.26 bar, namely above the “large volume fraction step” (see Section 3.1), the samples become white and solid (Fig. 2D and E). If a sample is compressed to 0.05 bar, then 39.75 bar, and finally de-compressed to 0.05 bar without any mechanical treatment, the solid re-dissolves spontaneously and completely, and becomes as clear and liquid as the original sample compressed at 0.05 bar, without any insoluble part remaining (Fig. 2F). This morphological reversibility needs to be confirmed from a thermodynamic point of view, as addressed in the following section.

3.3 Thermodynamic reversibility of the compression

We designed several experiments in order to verify that the same points on the osmotic pressure profile can be attained through different paths.

We performed osmotic compressions at 0.05 bar, 1.16 bar and 7.40 bar at pH 7 and $I = 20 \text{ mM}$. After equilibrium was reached, we immersed the dialysis bags in a PEG solution at a 39.75 bar osmotic pressure. After a new equilibrium, we brought each bag back to its initial osmotic pressure (“two-way compression”).

As shown in Fig. 1, for 3 cycles with different final osmotic pressures, we found that the final volume fractions were similar for samples obtained through one-way compression and through two-way compression.

We performed additional experiments at pH 7, $I = 35 \text{ mM}$ and pH 7, $I = 150 \text{ mM}$ (see Fig. S2 and S3, ESI[†]), and we also

changed the pathways of the cycles: for pH 7 and $I = 35 \text{ mM}$ (Fig. S3, ESI[†]), each sample was compressed to a different osmotic pressure and were then decompressed to the same osmotic pressure (0.57 bar). The results confirm that, on both sides of the “large volume fraction step”, one-way and two-way compressions are equivalent.

3.4 Influence of pH and ionic strength

In another set of osmotic stress experiments, we reduced the net charge of the protein to $Z = +6.3 e$ (see Materials and methods) by using a pH 9, $I = 20 \text{ mM}$ bis-tris propane buffer. Alternatively, we kept pH at 7 but adjusted the ionic strength to 35 mM and 150 mM by adding NaCl. Fig. 3 presents the (ϕ, Π) diagrams obtained for each condition, compared with the (ϕ, Π) diagram obtained at pH 7, $I = 20 \text{ mM}$.

Increasing pH at constant ionic strength or increasing the ionic strength at constant pH causes a shift in the experimental curve towards lower osmotic pressures in the dilute and the transition regimes. However, in the concentrated regime, the volume fraction is the same for all the conditions. Whatever pH and ionic strength, the evolution of the solution morphology follows the same pattern as for pH 7, $I = 20 \text{ mM}$, showing in particular solidification for concentrations above the “large volume fraction step”.

4 Discussion

The results presented above demonstrate that the use of osmotic stress applied through a dialysis equilibrium makes

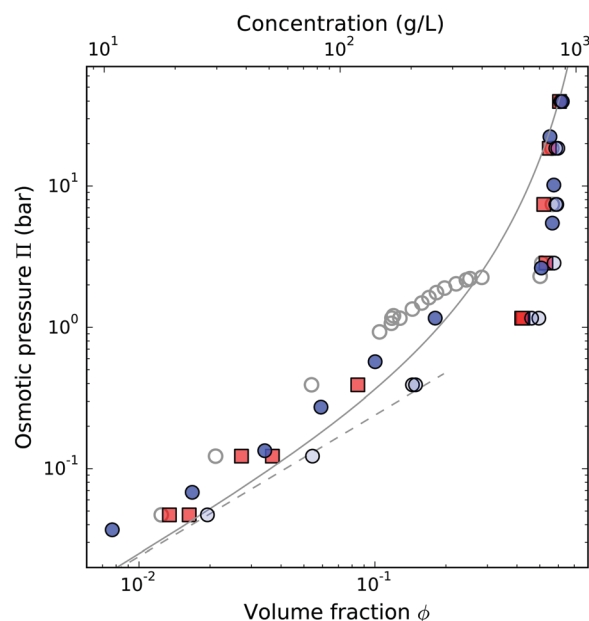


Fig. 3 (ϕ, Π) diagrams of lysozyme for several physicochemical conditions. Conditions presented are: pH 7, ionic strength $I = 20 \text{ mM}$ (grey empty circles); pH 7, $I = 35 \text{ mM}$ (dark blue circles); pH 7, $I = 150 \text{ mM}$ (light blue circles) and pH 9, $I = 20 \text{ mM}$ (red squares). The solid line represents the Carnahan–Starling model and the dashed line represents the van't Hoff model.

it possible to cover a volume fraction/osmotic pressure range that joins, at high concentrations, the data obtained through vapor sorption²⁹ (Fig. 1). The lowest concentrations that we have studied match the lysozyme concentration in egg white and the highest ones reach those commonly met in industrial processes.

The first aim of this section is to show that the reported (ϕ, Π) diagrams, unambiguously relating the volume fraction to the osmotic pressure of lysozyme solutions under chosen ionic conditions, consist of the reference experimental counterpart of equations of state (EOS) for lysozyme solutions. We shall then address the nature of the transition regime and its relationship to the volume fractions of the concentrated regime, by considering the nature of the interactions between solutes under the ionic conditions that are imposed by the outer stressing solution.

4.1 The (ϕ, Π) diagrams are reference experimental data for equations of state

The first argument comes from the thermodynamic reversibility of the transformations of the system. Preliminary observations of the morphology gave us a clue about this reversibility, as the samples get back to their liquid, clear form when decompressed to low osmotic pressures, even after having been strongly compressed at 39.75 bar. Focusing on the (ϕ, Π) diagrams reveals that compressing a lysozyme solution to 39.75 bar and decompressing it back to a lower pressure is equivalent to a one-way compression to the lowest pressure, for ionic strengths ranging from 20 mM to 150 mM at pH 7. The analysis of the pH 7, $I = 20$ mM samples by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) clearly showed that the system was composed of the same structural entities, regardless of the volume fraction or the pathway (Fig. S4, ESI†). All these features proved that the state of the solution reversibly depends on the pressure, volume fraction and physicochemical conditions, and not on the compression history.

Considering the above discussion, in addition to the fact that the diagrams originate from several datasets and batches of protein, we can state that we established the reference experimental data for equations of state (EOS) of lysozyme solutions, for ionic strengths up to 150 mM.

4.2 Nature of the transition regime

Since our data points identify equilibrium states of the system, the existence of a plateau, where the chemical potential of water remains nearly constant over a large range of volume fractions, must reflect the existence of a phase transition.

Small angle X-ray scattering (SAXS) data obtained in the concentrated regime reveal lysozyme crystallization, as shown by Bragg peaks, under all ionic conditions up to $I = 150$ mM. As an example, the structure factors of lysozyme solutions in a pH 7, $I = 20$ mM buffer compressed at 1.16 bar and 39.75 bar are presented in Fig. S5, ESI†. We therefore propose that the phase transition evidenced by the (ϕ, Π) diagrams is caused by crystallization of the protein. This hypothesis is consistent with the solubilities determined by Retaillieu *et al.*⁴⁴ for lysozyme at

pH 6.5 and different NaCl concentrations ($\phi = 0.25, 0.15$ and 0.10 for 0 mM, 50 mM and 100 mM NaCl, respectively).

We interpret the SAXS spectra as powder diffraction spectra. The major crystalline form is tetragonal, of the $P4_32_12$ space group, as found in numerous crystallographic structures of lysozyme (see *e.g.* 1HEL⁴⁵). Fitting the lattice parameters allows us to estimate the volume fraction of protein in the crystal. As shown in Fig. 1, the values that result from the fit are quite consistent with the volume fractions of the samples in the concentrated regime, indicating that all the lysozyme was crystallized in these samples. The volume fraction variations between the points shown in the diagram are related to slight changes in the $P4_32_12$ lattice parameters.

Rickard *et al.*²⁹ found higher osmotic pressures at volume fraction $\phi = 0.52$ and did not mention crystallization. This is easily explained by the kinetics of concentration in that case. Indeed, the dehydration method used by Rickard *et al.* causes a rapid concentration of the lysozyme solution, leading to a glassy state within the compressed droplets. Therefore the crystals do not nucleate, and the (ϕ, Π) diagram follows a liquid-like tendency, parallel to the Carnahan–Starling model, instead of following the bend caused by crystallization in our slow equilibrium experiments. The ratio of osmotic pressures of the glassy and crystal states ($\times 10$) is comparable with the solubility ratios commonly found for amorphous and crystalline solids.

The question then arises from the smoothness of the change in the slope at the beginning of the transition regime. Indeed, as soon as the nuclei of the crystal have reached the critical size, crystallization should occur without any barrier. Therefore the concentration in the liquid protein phase would remain constant as the chemical potential of lysozyme must be the same in the liquid and crystallized phases. Accordingly, the data would then show an angular profile at the leading edge of the plateau, instead of the smooth pretransition bending shown in Fig. 1 and 3.

The existence of an intermediate regime of sub-critical nuclei, or equilibrium clusters,^{24,25} could explain the pre-transition bending, as the concentration range where the equilibrium clusters have been observed ($\phi = 0.12$ – 0.23) is consistent with most of the transition regime of the (ϕ, Π) diagram, and the conditions are quite close to ours:²⁵ low ionic strength, pH 7.8 instead of 7, and the same temperature, 25 °C. In the next section, we will however show that the pre-transitional bending can also be explained quantitatively by the effects of ionic screening and van der Waals forces.

4.3 Interactions between proteins

Since the structure of lysozyme molecules remains the same through the whole range of pressures and volume fractions, it becomes interesting to compare the osmotic pressures of their solutions with those from dispersions of monodisperse spherical particles. A first observation is that the Carnahan–Starling equation of state provides a surprisingly good fit to the data over 4 decades in pressures, and even at concentrations where the virial equation of state with only 2-body interactions is not expected to hold (Fig. 1). Here we show that deviations

from the Carnahan–Starling equation can be partly accounted for by taking into account the ionic interactions between proteins, and their interactions due to van der Waals forces.

To explain the impact of ionic conditions on osmotic pressures in the dilute regime, with the simple hypotheses that lysozyme molecules are spheres with a uniform surface charge density and following a mean-field approach, we developed a generalized van der Waals (GVDW) model (see the full development in the ESI†) leading to the expression of the osmotic pressure as a function of an effective pair potential:

$$\beta\Pi\frac{v}{\phi} = \frac{1 + \phi + \phi^2 - \phi^3}{(1 - \phi)^3} + 2\pi\frac{\phi}{v}\int_{2a}^{\infty}\beta w(r)r^2dr \quad (4)$$

where $\beta = 1/k_B T$ is the reciprocal of the thermal energy, Π is the osmotic pressure, v is the protein molecular volume, ϕ is the volume fraction, a is the molecular hard-core radius, r is the intermolecular center-to-center distance and w is an effective pair potential.

In order to account for the shift of the experimental osmotic pressures upon changes in pH or ionic strength, we describe the contribution of screened ionic repulsions to the pair potential by a Debye–Hückel potential

$$\beta w_{DH}(r) = \frac{Z^2 L_B}{(1 + \kappa a)^2} \frac{e^{-\kappa(r-2a)}}{r} \quad (5)$$

where Z is the molecular charge and L_B is the Bjerrum length. κ is the reciprocal of the screening length and, if the protein counterions are taken into account, κ is defined by:

$$\kappa^2 = 4\pi L_B N_A (2C_S + ZC_P) \quad (6)$$

where N_A is the Avogadro constant, C_S is the pair concentration of monovalent salt and C_P is the protein molar concentration.

The contribution of short-ranged van der Waals forces to the effective pair potential is accounted for by a Hamaker potential

$$\beta w_H(r) = -\frac{A_H}{6} \left(\frac{2a^2}{r^2 - 4a^2} + \frac{2a^2}{r^2} + \ln \left(\frac{r^2 - 4a^2}{r^2} \right) \right) \quad (7)$$

for $r > 2a$, infinity otherwise, where A_H is the Hamaker constant (in $k_B T$ units).

The total pair potential can be written as $w(r) = w_{DH}(r) + w_H(r)$, and the expression of osmotic pressure given by eqn (4) can then be fitted to the experimental data, through numerical integration of its interaction term, using the Hamaker constant A_H as the only adjustable parameter (the lower integration limit was increased by 0.02 nm to avoid divergence).

We fit this model in the packing fraction region below the crystallization, with a global A_H , common to all pH and ionic strength conditions. The protein charge Z was fixed to the theoretical net charge of the protein for the considered pH. The results are shown in Fig. 4, where the model is drawn on the experimental points used for the fitting.

In spite of large approximations (lysozyme figured as a spherical molecule with uniform surface charge density, mean-field model assuming a step-shaped pair correlation function), our single-parameter GVDW model accounts strikingly well for the shape of the experimental data in the low-concentration

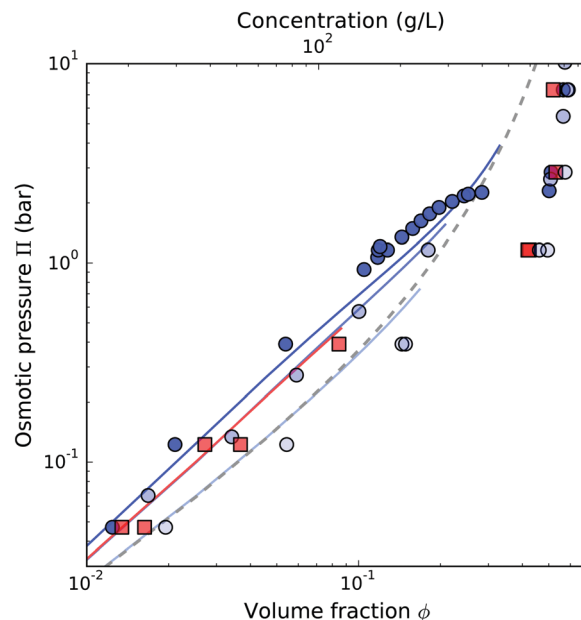


Fig. 4 Fit of the generalized van der Waals model to the experimental osmotic pressures of lysozyme in the dilute region. The model (solid lines) was fitted simultaneously to the 4 plotted series of experimental data, using Z/e values of 8.3 and 6.3 at pH 7 (circles) and pH 9 (squares), respectively. The corresponding fitted value of the Hamaker constant is $3.76 k_B T$. Conditions are pH 7, $I = 20$ mM (dark blue), pH 7, $I = 35$ mM (medium blue), pH 7, $I = 150$ mM (light blue) and pH 9, $I = 20$ mM (red). The model lines are plotted only in the volume fraction range used for the fit. The dashed line represents the Carnahan–Starling model.

range, as well as for their tendency to shift upon changes in the ionic conditions.

As regards the shape of the (ϕ, Π) diagrams, especially the downward bending observed below the crystallization plateau, it is important to point out that the counterions of the proteins strongly screen the electrostatic interactions, especially at high protein volume fractions, and that it is necessary to take this contribution into account in order to reproduce the shape of the data in the dilute and transition regime (see Fig. S6, ESI† for example at pH 7 and ionic strength 20 mM). The increase of the concentration of these counterions, and thus of the effective ionic strength, with volume fraction may be a cause of the existence of equilibrium clusters in a concentration range that is consistent with the transition regime of the (ϕ, Π) curve. Indeed, the bending of the curve occurs when the counterion concentration is sufficient to decrease significantly the repulsions between proteins and thus favors the attractions, giving rise to a new balance of interactions. Moreover, the aggregation number of the equilibrium clusters has been shown to be related to changes that favor attractions over repulsions, such as a decrease of the temperature or an increase of the salt concentration, but also to the increase in volume fraction.^{24,25} The latter point could be explained by the increase in counterion concentration, which has a major effect in screening ionic repulsions, as explained above. This screening of ionic repulsions may cause an increase in the size of the equilibrium cluster, until the repulsions are so low that a barrier no longer exists for lysozyme self-association.

At this point the association of lysozyme into equilibrium clusters is preempted by crystallization.

The fitted model still fails to describe quantitatively the strength of ionic repulsions at low ionic strength, and also the strength of attractions at high ionic strength.

The discrepancy between the experimental data and the model could be due to the simplicity of the assumptions of our model (uniformly charged spherical particles). It could also be due to specific interactions of salt ions with protein residues, which are the subject of a very active debate.^{46–50} In particular, deviations of the effective net charge from the predicted one may be caused by added salt due not only to ionic strength effects but also to specific ion effects.^{51–53}

5 Conclusion

Our results show complete experimental osmotic pressures *vs.* volume fraction for the aqueous solutions of a protein. Each point of these curves illustrates an equilibrium state of the lysozyme solution. Relationships between the osmotic pressure and the concentration in solutions of lysozyme and a few other proteins have already been described,^{11–14,20,54,55} but our experiments span much wider ranges of osmotic pressures and concentrations. As a consequence, all the states classically described for protein solutions have been explored, from the ideally dilute solution to the solid state, for which the solidus line, usually extrapolated from the density of crystals, is poorly described in phase diagrams.⁵⁶ Moreover, these data highlight the crystallization transition, and its displacement towards lower volume fractions caused by the decrease of the range and the strength of electrostatic interactions. The crystallization transition shown by our data is consistent with the solubility data available in the literature,⁴⁴ and with a crystal space group well known for lysozyme.⁴⁵

Simple colloidal models, without interactions other than steric, such as the Carnahan–Starling model, do not reproduce any of our data series. However, for all our experimental data, the low packing fraction region up to the crystallization event is correctly described by the combination of a steric repulsion (Carnahan–Starling model), van der Waals forces and a screened electrostatic repulsion as described by the classical Debye–Hückel potential, provided that the contribution from the counterions of the proteins to the screening is taken into account. Quantitative agreement between this model and the experimental data would probably require to take into account the shape and charge distribution of the molecules. The possible specific interactions between ions and protein residues^{51,57–59} could also make the electrical charge of the protein deviate from theoretical predictions based on the pK_a of the amino acids.

The mechanisms involved in our description of the dilute part of the osmotic pressure *vs.* volume fraction of lysozyme, *i.e.* the balance between short-range attraction and long-range repulsion, have been described for colloids⁶⁰ and lysozyme²⁴ and may be applicable to other proteins. However, some features of our experimental data are related to specific properties of

lysozyme, like its ability to crystallize under the physicochemical conditions we used. Indeed, the plateau reflecting the crystallization transition has not yet been observed for other globular proteins, such as ovalbumin¹² or BSA.¹¹ This may be due to the smaller range of concentrations, but more likely to the experimental conditions (pH, ionic strength, nature of salts, kinetics of concentration, temperature) that, depending on the protein, favor behaviors other than crystallization when the solutions are highly concentrated. The high concentration part of the osmotic pressure *vs.* volume fraction curve is then probably also controlled by other protein properties, such as the anisotropy of the shape and charge density. The determination of the contribution of these structural specificities in the equations of state of proteins is still to be explored.

Acknowledgements

The authors thank Martine Meireles, Yannick Hallez, Christophe Labbez, Marie Skepö, Valérie Briard-Bion, and Julien Jardin for helpful discussions.

References

- 1 A. D. Marshall, P. A. Munro and G. Trägårdh, *Desalination*, 1993, **91**, 65–108.
- 2 M. E. M. Cromwell, E. Hilario and F. Jacobson, *AAPS J.*, 2006, **8**, E572–E579.
- 3 P. Ball, *Nat. Mater.*, 2012, **11**, 185.
- 4 A. U. Borwankar, A. K. Dinin, J. R. Laber, A. Twu, B. K. Wilson, J. A. Maynard, T. M. Truskett and K. P. Johnston, *Soft Matter*, 2013, **9**, 1766.
- 5 K. P. Johnston, J. A. Maynard, T. M. Truskett, A. U. Borwankar, M. A. Miller, B. K. Wilson, A. K. Dinin, T. A. Khan and K. J. Kaczorowski, *ACS Nano*, 2012, **6**, 1357–1369.
- 6 R. J. Ellis and A. P. Minton, *Nature*, 2003, **425**, 27–28.
- 7 A. Saluja and D. S. Kalonia, *Int. J. Pharm.*, 2008, **358**, 1–15.
- 8 F. Carlsson, M. Malmsten and P. Linse, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 12189–12195.
- 9 F. Cardinaux, E. Zaccarelli, A. Stradner, S. Bucciarelli, B. Farago, S. U. Egelhaaf, F. Sciortino and P. Schurtenberger, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 7227–7237.
- 10 C. Gögelein, G. Nägele, R. Tuinier, T. Gibaud, A. Stradner and P. Schurtenberger, *J. Chem. Phys.*, 2008, **129**, 085102.
- 11 V. L. Vilker, C. K. Colton and K. A. Smith, *J. Colloid Interface Sci.*, 1981, **79**, 548–566.
- 12 M. A. Yousef, R. Datta and V. G. J. Rodgers, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **243**, 321–325.
- 13 Y. U. Moon, C. O. Anderson, H. W. Blanch and J. M. Prausnitz, *Fluid Phase Equilib.*, 2000, **168**, 229–239.
- 14 Y. U. Moon, R. A. Curtis, C. O. Anderson, H. W. Blanch and J. M. Prausnitz, *J. Solution Chem.*, 2000, **29**, 699–718.
- 15 C. Bonnet-Gonnet, L. Belloni and B. Cabane, *Langmuir*, 1994, **10**, 4012–4021.
- 16 A. S. Robbes, F. Cousin and G. Meriguet, *Braz. J. Phys.*, 2009, **39**, 156–162.

- 17 C. Martin, F. Pignon, A. Magnin, M. Meireles, V. Lelièvre, P. Lindner and B. Cabane, *Langmuir*, 2006, **22**, 4065–4075.
- 18 A. Mourchid, A. Delville, J. Lambard, E. Lécolier and P. Levitz, *Langmuir*, 1995, **11**, 1942–1950.
- 19 C. Vauthier, B. Cabane and D. Labarre, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, **69**, 466–475.
- 20 A. Bouchoux, G. Gésan-Guiziou, J. Pérez and B. Cabane, *Biophys. J.*, 2010, **99**, 3754–3762.
- 21 A. Bouchoux, P.-E. Cayemite, J. Jardin, G. Gésan-Guiziou and B. Cabane, *Biophys. J.*, 2009, **96**, 693–706.
- 22 R. Parker, T. R. Noel, G. J. Brownsey, K. Laos and S. G. Ring, *Biophys. J.*, 2005, **89**, 1227–1236.
- 23 G. J. Brownsey, T. R. Noel, R. Parker and S. G. Ring, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 3943–3950.
- 24 A. Stradner, H. Sedgwick, F. Cardinaux, W. C. K. Poon, S. U. Egelhaaf and P. Schurtenberger, *Nature*, 2004, **432**, 492–495.
- 25 A. Stradner, F. Cardinaux and P. Schurtenberger, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 21222–21231.
- 26 A. Shukla, E. Mylonas, E. D. Cola, S. Finet, P. Timmins, T. Narayanan and D. I. Svergun, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 5075–5080.
- 27 P. Kowalczyk, A. Ciach, P. Gauden and A. Terzyk, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, **363**, 579–584.
- 28 Y. Liu, L. Porcar, J. Chen, W.-R. Chen, P. Falus, A. Faraone, E. Fratini, K. Hong and P. Baglioni, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 7238–7247.
- 29 D. L. Rickard, P. B. Duncan and D. Needham, *Biophys. J.*, 2010, **98**, 1075–1084.
- 30 O. D. Velev, E. W. Kaler and A. M. Lenhoff, *Biophys. J.*, 1998, **75**, 2682–2697.
- 31 A. C. Dumetz, A. M. Chockla, E. W. Kaler and A. M. Lenhoff, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 570–583.
- 32 D. F. Rosenbaum and C. F. Zukoski, *J. Cryst. Growth*, 1996, **169**, 752–758.
- 33 E. J. Park and Y. C. Bae, *Biophys. Chem.*, 2004, **109**, 169–188.
- 34 S. P. Rozhkov and A. S. Goryunov, *Biophys. Chem.*, 2012, **170**, 34–41.
- 35 M. Muschol and F. Rosenberger, *J. Chem. Phys.*, 1997, **107**, 1953.
- 36 J. Wang, M. Dauter, R. Alkire, A. Joachimiak and Z. Dauter, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2007, **63**, 1254–1268.
- 37 H. Li, A. D. Robertson and J. H. Jensen, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2005, **61**, 704–721.
- 38 M. H. M. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski and J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, **7**, 525–537.
- 39 J. A. Cohen, R. Podgornik, P. L. Hansen and V. A. Parsegian, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 3709–3714.
- 40 V. A. Sirotkin, I. A. Komissarov and A. V. Khadiullina, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 4098–4105.
- 41 N. F. Carnahan and K. E. Starling, *J. Chem. Phys.*, 1969, **51**, 635–636.
- 42 A. Humeny, T. Kislinger, C.-M. Becker and M. Pischetsrieder, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 2153–2160.
- 43 P. Richard, L. Oger, J.-P. Troadec and A. Gervois, *Phys. Rev. E: Stat. Phys., Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, 1999, **60**, 4551–4558.
- 44 P. Retailleau, M. Riès-Kautt and A. Ducruix, *Biophys. J.*, 1997, **73**, 2156–2163.
- 45 K. P. Wilson, B. A. Malcolm and B. W. Matthews, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 10842–10849.
- 46 P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, **4**, 4258–4259.
- 47 K. B. Rembert, J. Paterová, J. Heyda, C. Hilty, P. Jungwirth and P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 10039–10046.
- 48 J. Paterová, K. B. Rembert, J. Heyda, Y. Kurra, H. I. Okur, W. R. Liu, C. Hilty, P. S. Cremer and P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 8150–8158.
- 49 H. I. Okur, J. Kherb and P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 5062–5067.
- 50 W. J. Xie and Y. Q. Gao, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, **4**, 4247–4252.
- 51 A. Kurut and M. Lund, *Faraday Discuss.*, 2013, **160**, 271–278.
- 52 M. Boström, D. R. M. Williams and B. W. Ninham, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 686–694.
- 53 C. A. Haynes, E. Sliwinsky and W. Norde, *J. Colloid Interface Sci.*, 1994, **164**, 394–409.
- 54 C. A. Haynes, K. Tamura, H. R. Korfer, H. W. Blanch and J. M. Prausnitz, *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**, 905–912.
- 55 D. Farrer and A. Lips, *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 281–286.
- 56 P. G. Vekilov, *Soft Matter*, 2010, **6**, 5254–5272.
- 57 M. Boström, F. W. Tavares, S. Finet, F. Skouri-Panet, A. Tardieu and B. W. Ninham, *Biophys. Chem.*, 2005, **117**, 217–224.
- 58 Y. Zhang and P. S. Cremer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 15249–15253.
- 59 J. Zhang, in *Protein-Protein Interactions – Computational and Experimental Tools*, ed. W. Cai, InTech, 2012, pp. 359–376.
- 60 J. Groenewold and W. K. Kegel, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 11702–11709.

Electronic supplementary information

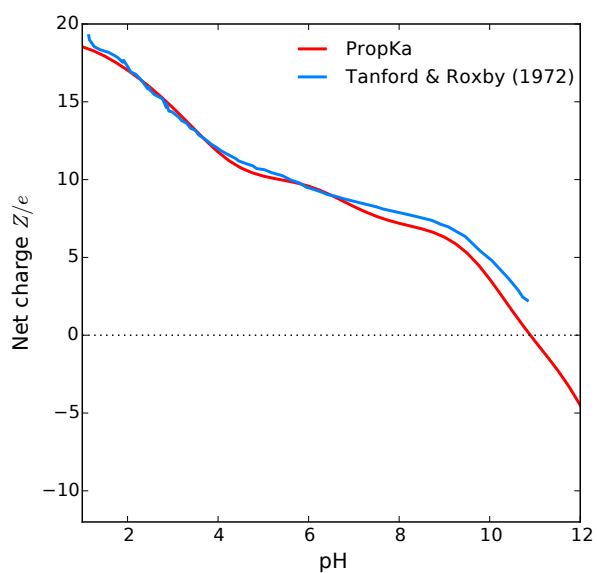


Figure S1: Lysozyme titration curves, obtained with the program PropKa^{1,2} using the three-dimensional structure (PDB ID: 2VB1³) (red line) or experimentally by Tanford and Roxby in a KCl solution at a 100 mM ionic strength⁴ (blue line).

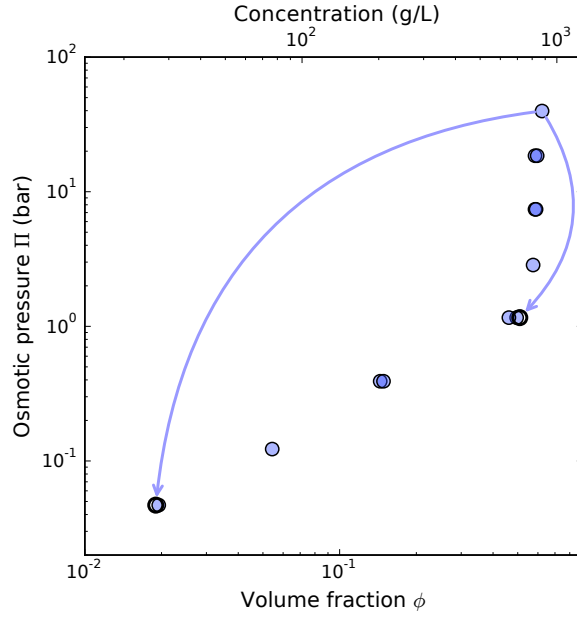


Figure S2: Reversibility of osmotic stress of lysozyme at pH 7, $I = 150$ mM. (ϕ, Π) diagram of lysozyme in a pH 7, $I = 150$ mM bis-tris propane buffer, obtained by one-way compression (filled blue circles), or by compression to 39.75 bar followed by decompression to 1.16 bar and 0.05 bar (“two-way compression”, empty black circles). The arrows symbolize the decompression part of the two-way compression experiments.

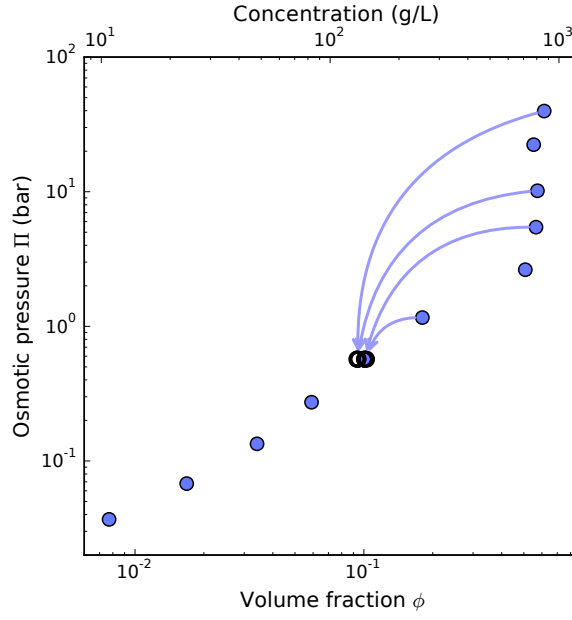


Figure S3: Reversibility of osmotic stress of lysozyme at pH 7, $I = 35$ mM. (ϕ, Π) diagram of lysozyme in a pH 7, $I = 35$ mM bis-tris propane buffer, obtained by one-way compression (filled blue circles), or by compression to 1.16 bar, 5.45 bar, 10.16 bar and 39.75 bar followed by decompression to 0.57 bar (“two-way compression”, empty black circles). The arrows symbolize the decompression part of the two-way compression experiments.

Secondary structure of lysozyme (pH 7, $I = 20$ mM buffer). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) is sensitive to the secondary structure of globular proteins. It has been widely used to evidence conformation changes and aggregation of lysozyme^{5–12}.

Attenuated total reflectance (ATR) spectra of protein solutions were measured at a 4 cm^{-1} resolution using a Bruker Tensor 27 spectrometer, a Pike MIRacle ATR accessory equipped with a monoreflection germanium crystal and a liquid nitrogen-cooled Hg-Cd-Te photovoltaic detector (Bruker). 128 scans were averaged using the Bruker Opus software, and corrected for water vapor and carbon dioxide contributions.

Fig. S4 presents the amide I and amide II region of mid-infrared spectra for lysozyme in pH 7, $I = 20$ mM buffer. Two of the presented spectra correspond to pressures close to 1.16 bar, reached either through one-way compression, or through two-way compression. Two other spectra correspond to pressures on both sides of the “large volume fraction step”, namely 2.17 bar and two-way compression 7.40 bar. The last spectrum is that of the stock solution of lysozyme at 50 g/L, which serves as a reference sample.

In spite of obvious differences in signal/noise ratio due to large differences in concentration between the reference stock solution and the compressed samples, all the spectra show very similar secondary structures. Indeed, the spectra of the samples belonging to the dilute regime (1.16 bar) and to the concentrated regime (7.40 bar) are almost superimposable, showing that no major change in secondary structure and no aggregation occurs during and after the transition, despite the very high volume fractions attained.

Moreover, we can see that the samples obtained by one-way or two-way compression are identical. Therefore the process of compressing the samples up to the maximum volume fraction (at 39.75 bar) and bringing it back to the initial state does not change the secondary structure of the protein. This structural reversibility corroborates the thermodynamic and morphologic reversibility of the compression discussed above.

Small-angle X-ray scattering (SAXS). SAXS experiments were performed on the SWING line of SOLEIL synchrotron, at Gif-sur-Yvette (France). The incident beam wavelength was $1.0332\text{ \AA}$ (12 keV). We used a detector distance of 1.5885 m for the dilute samples (concentration lower than 10 g/L) and two distances, 5.130 m and 1.130 m, for the concentrated samples. The total q range spans from $1.8 \times 10^{-3}\text{ \AA}^{-1}$ to $0.99\text{ \AA}^{-1}$.

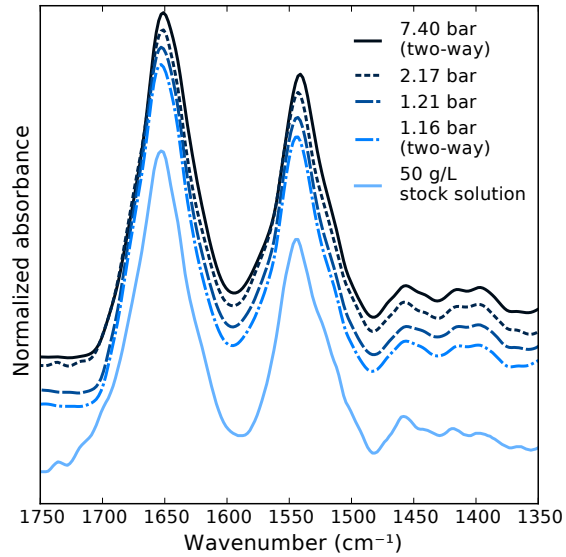


Figure S4: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectra of lysozyme 50 g/L stock solution, and samples compressed to 1.21 bar and 2.17 bar, and decompressed to 1.16 bar and 7.40 bar after compression to 39.75 bar. The spectra were scaled and shifted upwards for better clarity.

The dilute samples were obtained for every physicochemical condition by direct dilution of lysozyme powder in the buffer, in order to attain concentrations of 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L, 8 g/L and 10 g/L. These samples were used to measure the form factor of lysozyme in every physicochemical condition. The concentrated samples were obtained by osmotic compression.

Fitting of the Bragg peak positions was realized with the Fityk software¹³ and its module dedicated to powder diffraction analysis, using the Pawley method, i.e. simultaneous optimization of all parameters, the peak positions being constrained by the space group choice. Optimization was performed using the Levenberg-Marquardt algorithm.

Generalized van der Waals model (GVDW). Consider a system consisting of N molecules of radius a dispersed in a volume V at constant temperature T . In a mean field approach the average energy per particle is¹⁴:

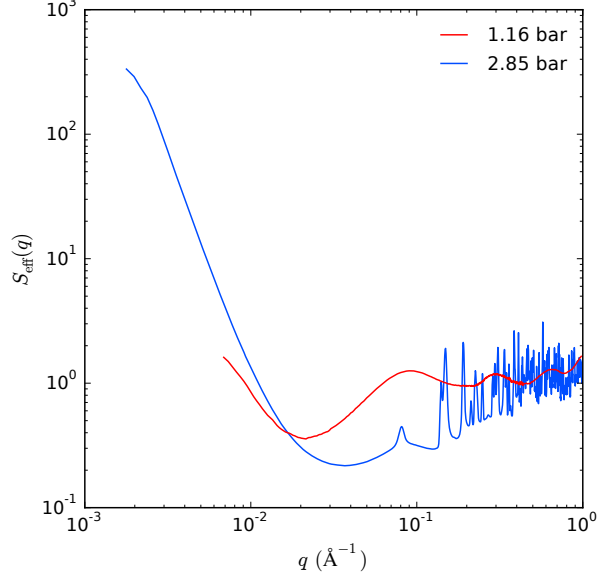


Figure S5: Effective SAXS structure factors of lysozyme solutions compressed to 1.16 bar (red curve) and 2.85 bar (blue curve) in a pH 7, $I = 20$ mM bis-tris propane buffer.

$$\beta\epsilon = 2\pi\rho \int_0^\infty g(r)\beta w(r)r^2 dr \quad (1)$$

where $\rho = N/V$ is the bulk number density, r the interparticle distance, $g(r)$ the radial distribution function, and w an effective pair potential. $\beta = 1/k_B T$ is the reciprocal of the thermal energy. The configurational integral (the static part of the partition function) can now be written as:

$$Z = \int e^{-\beta N\epsilon} d\mathbf{r}^N \quad (2)$$

We now face the problem that the solution structure, described by $g(r)$, is unknown and in the GVDW theory a simple step function is assumed: for $r < 2a$, $g(r) = 0$ while unity otherwise. With this simplification, using Stirling's approximation and neglecting the translational part of the partition function, the system free energy reduces to:

$$\beta A = -\ln \frac{Z}{N!} = N \ln \frac{N}{V - Nv} - N + 2\pi \frac{N^2}{V} \int_{2a}^{\infty} \beta w(r) r^2 dr \quad (3)$$

where $v = 4\pi a^3/3$ is the particle hard-sphere volume. The final pressure is now obtained as:

$$\beta \Pi = - \left(\frac{\partial \beta A}{\partial V} \right)_T = \frac{N}{V - Nv} + 2\pi \rho^2 \int_{2a}^{\infty} \beta w(r) r^2 dr \quad (4)$$

The above offers a molecular interpretation of the original van der Waals equation of state, where in the first term of purely entropic origin, $b = v$. The second term accounts for the mean interaction energy per particle, $K = -2\pi \int_{2a}^{\infty} \beta w(r) r^2 dr$. Here it should be noted that K may include both attractive and repulsive interactions and can be evaluated for any pair potential that decays as $1/r^3$ or faster.

The first term can be replaced by the Carnahan-Starling expression, $\rho \frac{1+\phi+\phi^2-\phi^3}{(1-\phi)^3}$, and the bulk number density be expressed as $\rho = \phi/v$.

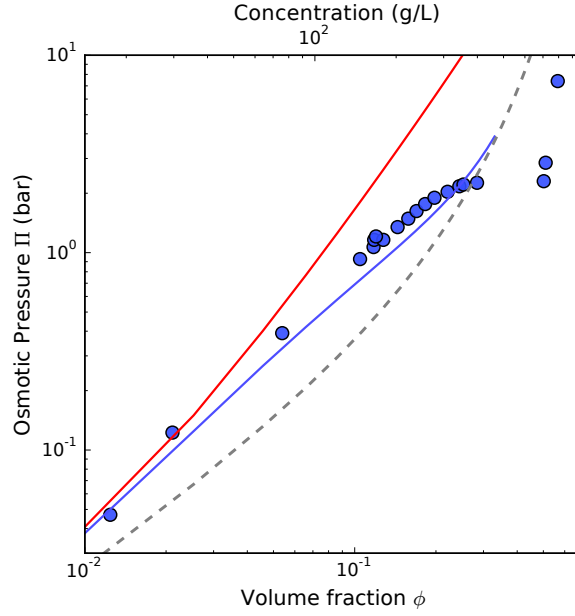


Figure S6: Generalized van der Waals (GVDW) model : contribution of lysozyme counterions to the screening of electrostatic interactions. The GVDW model, with (blue line) or without (red line) the contribution of lysozyme counterions to the effective ionic strength, was fitted globally to the dilute regime of experimental osmotic pressure *vs.* volume fraction data of lysozyme at pH 7, $I = 20$ mM; pH 7, $I = 35$ mM; pH 7, $I = 150$ mM and pH 9, $I = 20$ mM. For clarity, the experimental data and fitted models are plotted only for pH 7, $I = 20$ mM. The value of the adjusted Hamaker constant is $3.76 k_B T$ and $10.82 k_B T$ with and without contribution of counterions, respectively (for numerical integration of the interaction term, the lower limit was increased by 0.02 nm to avoid divergence). The model lines are plotted only in the volume fraction range used for the fit. The grey dashed line represents the Carnahan-Starling model.

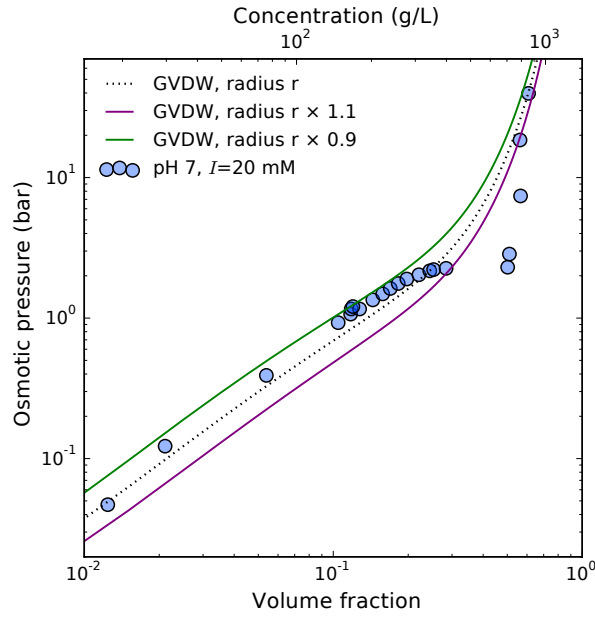


Figure S7: Impact of the value of the radius of the lysozyme model on the osmotic pressure predicted by the generalized van der Waals (GVDW) model. Together with the experimental osmotic pressures obtained at pH 7, $I=20$ mM (circles) and the fit of the GVDW model as in the manuscript, fig. 4 (dotted line), the GVDW model is also plotted for a model sphere with a radius 10 % higher (purple line) or lower (green line) than the radius calculated from lysozyme mass and specific volume.

References

- [1] H. Li, A. D. Robertson and J. H. Jensen, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2005, **61**, 704–721.
- [2] M. H. M. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski and J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, **7**, 525–537.
- [3] J. Wang, M. Dauter, R. Alkire, A. Joachimiak and Z. Dauter, *Acta Crystallogr., Sect. D*, 2007, **63**, 1254–1268.
- [4] C. Tanford and R. Roxby, *Biochemistry*, 1972, **11**, 2192–2198.
- [5] R. J. Green, I. Hopkinson and R. A. L. Jones, *Langmuir*, 1999, **15**, 5102–5110.
- [6] S. D. Allison, B. Chang, T. W. Randolph and J. F. Carpenter, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, **365**, 289–298.
- [7] A. Dong, T. W. Randolph and J. F. Carpenter, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 27689–27693.
- [8] F. Meersman and K. Heremans, *Biochemistry*, 2003, **42**, 14234–14241.
- [9] A. Hirano, H. Hamada, T. Okubo, T. Noguchi, H. Higashibata and K. Shiraki, *Protein J.*, 2007, **26**, 423–433.
- [10] A. Sethuraman and G. Belfort, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 1322–1333.
- [11] P. Sassi, A. Giugliarelli, M. Paolantoni, A. Morresi and G. Onori, *Biophys. Chem.*, 2011, **158**, 46–53.
- [12] Y. Zou, Y. Li, W. Hao, X. Hu and G. Ma, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 4003–4013.
- [13] M. Wojdyr, *J. Appl. Crystallogr.*, 2010, **43**, 1126–1128.
- [14] S. Nordholm, *Properties of Molecular Fluids in Equilibrium*, Lecture notes, 2014.

