



HAL
open science

Influence de l'état protéique sur la dynamique de séparation de phase et de gélification dans un système ternaire aqueux à base de protéines de pois et d'alginate

Jean-Luc Mession

► **To cite this version:**

Jean-Luc Mession. Influence de l'état protéique sur la dynamique de séparation de phase et de gélification dans un système ternaire aqueux à base de protéines de pois et d'alginate. Autre. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS030 . tel-00825480

HAL Id: tel-00825480

<https://theses.hal.science/tel-00825480>

Submitted on 23 May 2013

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.



Université de Bourgogne – Agrosup Dijon

UMR PAM 02.102, Equipe PAPC
Procédés Alimentaires et PhysicoChimie

Influence de l'état protéique sur la dynamique de séparation de phase et de gélification dans un système ternaire aqueux à base de protéines de pois et d'alginate

Thèse de doctorat en Science des Aliments

Présentée et soutenue publiquement

le 14/09/2012

par J.-L. Mession

Jury

Pr. M. Subirade (Université Laval INAF/STELA - Québec)	Rapporteuse
Pr. T. Nicolăi (Université du Maine Luman)	Rapporteur
Mme L. Donato-Capel (Nestlé Research Center, Lausanne - Suisse)	Examinatrice
Pr C. Sanchez (Université de Montpellier)	Président
Pr R. Saurel	Directeur de Thèse
Dr. A. Assifaoui (MCF)	Co-directeur de thèse

Dans la lutte entre toi et le monde, parie sur le monde

F. Zappa

A Lisa, évidemment...

Avant-propos

Débutée le 2 février 2009 au sein de l'équipe EMMA (Eau, Molécules actives, Macromolécules, Activités), cette thèse a pour objectifs premiers le concept, la formulation et la caractérisation de gels mixtes de deux biopolymères d'origine végétale.-L'intérêt d'un tel système ternaire protéine - polyside - eau est triple ; (i) le développement d'un nouveau système alimentaire simplifié semi-solide (ii) dont le mode de gélification à froid permettrait de mettre au point dans le même temps (iii) une matrice d'encapsulation d'agents thermosensibles. Une utilisation pratique de nos gels serait le piégeage et la libération de « composés actifs phytobiotiques naturels », qui aideraient à la croissance de plantes type pommes de terres. Une stratégie ambitieuse serait par exemple le réensemencement du sol par une microflore symbiotique de la plante d'intérêt, Une autre voie à serait l'introduction d'éliciteurs qui pourrait inhiber. L'implantation et le développement de pathogènes. En effet, notre projet s'intègre dans un programme plus vaste - le FUI Qualivivant (Fond Unique Interministériel) - à l'initiative du pôle de compétitivité Vitagora (Vitagora News, 2008 ; Vitaneews, 2010). Les problématiques de recherche abordées dans le cadre de ce programme visaient à développer de nouveaux traitements bio-phytosanitaires. Un autre volet du programme concernait l'effet de tels nouveaux traitements sur les plans nutritif et sensoriel de plusieurs variétés de pommes de terre. Toutefois, la validation des formulations de cocktails phytobiotiques pour une homologation demande davantage de reproductibilité des expérimentations, qui s'étaleront encore sur plusieurs saisons de récolte.

En ce qui nous concerne, (i) la compréhension et la caractérisation des biopolymères utilisés, (ii) la construction et la formulation d'un système mixte aqueux protéine globulaire-polyside, et (iii) la mise en œuvre d'un procédé de gélification ont animé la quasi-totalité de nos travaux de recherche. D'emblée le choix de l'alginate s'imposait : celui-ci est capable de former des gels à froid par ajout de cations divalents (calcium) (Nussinovitch, 1996). La gélification peut-être opérée par (i) une dialyse ou un trempage dans un bain de calcium ionique, ou (ii) par libération interne de calcium (Neiser, Draget, & Smidsrød, 1999). L'alginate est employé dans de nombreuses applications biomédicales (Draget & Taylor, 2006) et pharmaceutiques afin d'encapsuler des probiotiques (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011). Dans le domaine agronomique, il peut entrer dans la composition de biosorbants

Avant-propos

pour la détoxification des sols (Rocher, 2008). Des billes d'alginate ont également permis d'encapsuler des composés herbicides et assimilés (Pepperman & Kuan, 1994). Enfin, l'alginate peut complexer des métaux lourds et piéger des composés hydrophobes (Park, Kim, Chae, & Yoo, 2007 ; Davis, Volesky, & Mucci, 2003). Parce que la littérature abondait sur les propriétés stabilisantes et texturantes des protéines et des polyosides, il nous semblait difficile de nous écarter du domaine alimentaire. A ce sujet, le choix de protéines globulaires végétales a été premièrement influencé par des questions de coût pour les applications envisagées. Deuxièmement, le besoin de développer des sources protéiques végétales s'inscrit dans un souci de durabilité. Reconsidérer la question du coût total des énergies mobilisées et des rendements entre les productions animales et végétales semble d'intérêt public dans un monde où les ressources naturelles tendent à s'amenuiser, avec des déséquilibres alimentaires entre pays développés et pays pauvres qui se creusent ou du moins persistent (Carlsson-Kanyama, 2003 ; Dutilh & Kramer, 2000 ; Reijnders & Soret, 2003, FAO, 2007, <ftp://fao.org/docrep/fao/010/ah876f/>; FAO, 2008, <ftp://ftp.org/docrep/fao/011/io100f/>; FAO, 2009, <ftp://ftp.org/docrep/fao/011/io291f/>).

Du fait de l'occupation des surfaces cultivables, les besoins accrus en eau de l'élevage et les rendements faibles de conversion protéines végétales-animales, le coût économique réduit et la plus faible empreinte écologique des protéines de légumineuses devraient être davantage pris en compte. (Davis, Sonesson, Baumgartner & Nemecek, 2009, Lundqvist, 2007). Produites à destination de l'alimentation animale, les protéines de légumineuses présenteraient en revanche des propriétés physicochimiques à valoriser pour l'alimentation humaine (Boye, Zare, & Pletch 2011). Il y aurait ainsi une possibilité de substituer partiellement des ingrédients issus de la production animale, comme par exemple les protéines laitières (Cayot & Lorient, 1998). Le plus grand recours à d'autres sources protéagineuses par l'industrie agroalimentaire contrebalancerait dans le même temps le monopole des isolats protéiques de soja (USDA, 2011).

Pour des raisons de climat tempéré plus adapté par rapport au soja et de l'ancrage de sa culture dans le savoir-faire agricole européen, le pois jaune et lisse (*Pisum sativum L.*) comme source protéique a été retenu (Guéguen, 1983 ; O'Kane, Happe, Vereijken, Gruppen, & van Boekel, 2004_{a,b,c}, 2005, FAO, 2005, www.foa.org/ES/ESC/fr/15/97/highlight_99.html).

Avant-propos

L'enjeu principal de cette étude reposait sur la mise au point d'un procédé de gélification alternatif à ceux les plus souvent décrits (Bryant & McClements, 1998) ; d'une manière générale, la gélification des protéines - et de systèmes plus complexes protéine-polyoside - s'opère par chauffage à des températures supérieures à 65°C suffisamment longtemps pour que les protéines s'organisent en un réseau gélifié (Beaulieu, Turgeon, & Doublier, 2001 ; Donato, Garnier, Novales, Durand, & Doublier, 2005 ; Neiser, Draget, & Smidsrød, 1998-1999). Cette procédure maintes fois décrite proscrit cependant la préservation de composés thermosensibles qui auraient été introduits préalablement dans le biomatériau gélifié obtenu. Néanmoins, les méthodes de gélification à froid conviendraient à la formulation d'aliments enrichis ou supplémentés en composés d'intérêts (antioxydant, vitamine, etc.). De plus, les conditions douces de gélification appliquées permettraient d'entrevoir l'encapsulation de matériaux vivants, particulièrement thermosensibles.

D'après les problématiques de recherche que nous nous étions fixés au départ, il nous semblait préférable d'opter pour une gélification lente et à froid de notre système protéines de pois-alginate. Ainsi une meilleure appréhension de la structuration du système dans le temps était possible, pour une meilleure maîtrise de la texture du produit gélifié final.

Le principe d'élaborer des gels multi-composés protéine-polyoside, repose sur la plus grande flexibilité de ses propriétés structurales, par rapport à des gels simples obtenus avec un seul biopolymère gélifiant. Il s'agissait bien là du cœur de notre questionnement : les corrélations entre échelles d'observation ont été notre motivation principale, depuis les interactions entre biopolymères qui conditionnent la microstructure des mélanges jusqu'à leurs propriétés rhéologiques lorsque ceux-ci sont gélifiés (stables) macroscopiquement.

Par ailleurs, il a été reporté que l'adjonction d'un polyoside pouvait améliorer les propriétés rhéologiques des gels protéiques, sous réserve de conditions expérimentales à déterminer (Turgeon & Beaulieu, 2001). Pour de tels gels constitués de deux biopolymères gélifiants, les propriétés rhéologiques dépendront de leur faculté à former des réseaux, dont les structurations respectives au cours de la gélification seront interdépendantes (Tolstoguzov, 1995).

Les choix stratégiques et les contraintes sont maintenant posés. Il nous faut dès à présent introduire la notion générale d'incompatibilité (ou d'immiscibilité) dans les systèmes aqueux protéine-polyoside (Tolstoguzov, 1986, 1991, 1995). Le passage d'un état liquide à un état semi-solide par gélification de tels systèmes mixtes permettrait de les figer dans un état

Avant-propos

thermodynamiquement instable, du moins à une échelle microscopique. L'établissement des relations d'interdépendance entre microstructure et propriétés de structure (rigidité, élasticité, porosité...) est à la base de la formulation d'aliments novateurs, ou plus largement de biomatériaux (Norton & Frith, 2001).

Table des matières

Introduction	1
1. Etudes bibliographiques	5
1.1. Propriétés structurales et physicochimiques des biopolymères utilisés	6
1.1.1. Les globulines de pois	6
1.1.1.1. Niveau de structure	6
1.1.1.2. Composition, rôle biologique des protéines de légumineuses ; le cas du pois.....	6
1.1.1.3. Variabilité dans les globulines de légumineuse : origine génétique et conséquences dans la composition en polypeptides	7
1.1.1.4. Les acides aminés des globulines de pois	12
1.1.1.5. Méthodes d'extraction	12
1.1.1.6. Paramètres influençant la solubilité des globulines végétales/du pois	16
1.1.1.7. Dénaturation thermique et voies d'agrégation, pré-requis à la gélification	18
1.1.1.8. Des gels thermiques de globulines végétales ; comparaisons pois-soja	23
1.1.1.9. Une alternative : des gels protéiques dits « à froid »	28
1.1.1.10. Bilan partiel	32
1.1.2. L'alginate de sodium	33
1.1.2.1. Les gommes industrielles : définition et sources	33
1.1.2.2. Les alginates : matières premières et fonction biologique.....	34
1.1.2.3. Extraction de l'alginate.....	35
1.1.2.4. Structure	35
1.1.2.5. Les alginates en solution	37
1.1.2.6. La gélification ionotropique de l'alginate : La « boîte à œufs ».....	40
1.1.2.7. Des procédés de gélification pour des gels d'alginate homogènes	45
1.2. Les systèmes mixtes protéine - polyoside - eau : caractérisation du comportement de phase et gélification	46
1.2.1. Des systèmes aqueux de biopolymères : états de phase.....	46
1.2.1.1. Approche qualitative.....	46
1.2.1.2. Etats de phase à l'équilibre	48
1.2.1.3. Niveaux d'incompatibilité	50
1.2.1.4. Approche thermodynamique : aspects quantitatifs.....	52
1.2.1.5. Les interactions non-spécifiques de déplétion	54
1.2.1.6. Cartographier le comportement de phase d'un système ternaire aqueux : les diagrammes de phase.....	57
1.2.1.7. Etude de cas : des systèmes aqueux incompatibles globulines-polyosides anioniques	59
1.2.1.8. Aspects cinétiques/mécanistiques de la séparation de phase.....	62
1.2.2. Les gels multi-composés de biopolymères	65
1.2.2.1. Classification.....	65

Table des matières

1.2.2.2. Compétition cinétique de séparation de phase/gélification	67
1.2.2.3. Gels thermiques de biopolymères : effets de la gélification du polyoside sur la structure à différentes échelles.....	69
1.2.2.4. Des mélanges gélifiés « à froid ».....	73
2. Objectifs de l'étude.....	78
2.1. Le choix d'un système multiphasique gélifié à froid	79
2.2. Plan des investigations (Figure 2)	80
2.2.1. Mélanges liquides - conditions non gélifiantes	80
2.2.2. De la gélification à la structure finale des gels.....	80
3. Matériels et méthodes.....	82
3.1. Matériels	83
3.1.1. Matières premières et préparation des solutions mères.....	83
3.1.1.1. Les globulines de pois	83
3.1.1.2. L'alginate de sodium.....	85
3.1.1.3. Préparation des solutions mères	86
3.1.2. Préparation des mélanges.....	87
3.1.2.1. Mélanges liquides globulines de pois natives/agrégées-alginate de sodium, dans 0,1 M NaCl, pH 7.2.....	88
3.1.2.2. Gélification de mélanges globulines de pois natives/pré-agrégées-alginate dans 0,1 M NaCl, pH initial 7,2.....	88
3.2. Méthodes	89
3.2.1. Caractérisation des biopolymères extraits	90
3.2.1.1. Méthodes de routine.....	90
3.2.1.2. Caractérisation physicochimique de l'alginate purifié.....	91
3.2.1.3. Caractérisation des globulines de pois extraites.....	93
3.2.2. Caractérisation des mélanges de globulines de pois-alginate de sodium	96
3.2.2.1. Diagrammes de phase	96
3.2.2.2. Mesures rhéologiques	97
3.2.2.3. Etudes de microstructure par MCBL	99
3.2.2.4. Etude de l'ultrastructure par MET	102
4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à la gélification à froid	103
4.1. Caractérisation des biopolymères utilisés : effets de l'extraction	104
4.1.1. Les globulines de pois.....	104

Table des matières

4.1.2.	Caractérisation de l’alginate purifié.....	111
4.2.	Un système aqueux incompatible globulines de pois « natives » - alginate de sodium.....	115
4.2.1.	Diagramme de phase	116
4.2.2.	Données de microstructure au MCBL	119
4.3.	Une première tentative de gélification à froid des mélanges globulines de pois « natives »-alginate	126
4.3.1.	Cinétique d’acidification	127
4.3.2.	Suivi de la gélification	129
4.3.2.1.	Rhéologie dynamique aux faibles déformations.....	129
4.3.2.2.	Données de microstructure.....	134
5.	Un système incompatible globulines de pois pré-agrégées thermiquement - alginate; entre séparation de phase et gélification à froid	135
5.1	Préparation d’agrégats de globulines de pois et comportement de phase en mélange avec de l’alginate.....	137
5.1.1.	Enjeux	137
5.1.2.	Construction d’un système immiscible globulines de pois pré-agrégées-alginate	138
5.1.2.1.	Dénaturation thermique des globulines de pois (<i>Pisum sativum</i> L.) – interactions moléculaires induites par le chauffage menant à l’agrégation protéique (Manuscrit 1)	137
	Abstract	138
1.	Introduction	139
2.	Material and Methods.....	139
2.1.	Extraction of Pea Globulins.....	139
2.2.	Preparation of Heat-Induced Aggregates.....	140
2.3.	Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	141
2.4.	Free Sulfhydryl Contents Determination.....	142
2.5.	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	142
2.6.	High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	142
2.7.	Statistical Analysis.....	143
3.	Results.....	143

Table des matières

3.1.	DSC analysis.....	143
3.2.	Dermination of Free Sulphydryl Content.....	146
3.3.	Electrophoretic Patterns of LPP-control, LPP+NEM, LPP+DTT and Related APP Samples Under Denaturing (SDS) and Denaturing/reducing (with SDS+DTT) Conditions (Figure 1).....	148
3.4.	Effect of Heat-Treatment on Chromatographic Profiles at 215 nm of pea globulins (Figure 2).....	150
4.	Discussion.....	157
5.1.2.2	Comportement de phase et microstructure dans un système incompatible protéines de pois pré-agrégées - alginate	159
	Abstract	160
1.	Introduction	161
2.	Kinetics of demixing	163
3.	Materials and methods.....	164
4.	Results and discussion.....	167
5.	Conclusion	177
5.1.3.	Résultats principaux	178
5.2.	La gélification à froid de mélanges de globulines de pois pré-agrégées-alginate	179
5.2.1.	Enjeux	179
5.2.2.	Gélification à froid d'un système aqueux globulines de pois-alginate par libération <i>in situ</i> de calcium (Manuscrit 2)	179
	Abstract.....	179
1.	Introduction	180
2.	Materials and methods.....	183
2.1.	Materials.....	183
2.1.1.	Biopolymers.....	183
2.1.2.	Biopolymer stock solutions preparation.....	184
2.1.3.	Single-biopolymer/mixed gels preparation	184
2.2.	Methods	185
2.2.1.	Continuous pH monitoring and free calcium release.....	185
2.2.2.	High field ¹ H-nuclear magnetic resonance (NMR).....	185
2.2.3.	Small-strain oscillatory shear measurements	186

Table des matières

2.2.4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM).....	186
2.2.5. Image texture analysis.....	187
2.2.6. Transmission electron microscopy (TEM)	188
3. Results.....	187
3.1 Kinetics of acidification.....	187
3.2. Rheological measurements	191
3.2.1. Single-alginate solutions.....	192
3.2.3. Pre-aggregated pea proteins - alginate mixtures	196
3.3. Microstructure analysis by CLSM of mixed gels	200
3.4. Microstructure analysis by TEM.....	204
4. Conclusion.....	208
5.2.3. Données complémentaires: supporting information.....	208
5.2.3.1. Domaine de linéarité des mesures en rhéologie dynamique - linear viscoelastic region of the measurements.....	208
5.2.3.2. La gélification des protéines seules - gelation of single-protein solutions.....	208
5.2.3.3. Décalage entre détection de la transition sol-gel et véritable départ de la gélification – a « decay » between sol-gel transition detection and onset of gelation	211
5.2.3.4. Spectres mécaniques: complément d'informations – Mechanical spectra: complementary data.....	212
5.2.4. Autres cas de gels mixtes: concentration en protéines et quantité de CC variables	216
5.2.4.1. Données de rhéologie.....	216
5.2.4.2. Données de microstructure.....	219
6. Bilan des travaux de gélification.....	222
6.1. La gélification de l'alginate.....	224
6.2. Gélification à froid des mélanges ; rôles combinés de l'alginate et de la quantité de calcium disponible	225
6.2.1. Etat du système protéines pré-agrégées-alginate (hors ajout GDL/CaCO ₃)	225
6.2.2. Ajout de GDL/CC : gélification induite	226
6.2.2.1. Protéines seules : absence de gélification	226
6.2.2.2. Mélanges globulines pré-agrégées-alginate.....	227

Table des matières

Conclusion et perspectives	230
Partie « publications »	236
Publication 1 (P1)	237
Publication 2 (P2)	238
Annexes	239
Annexe 1 : acides aminés	240
Annexe 2 : Analyse enthalpique différentielle (AED)	241
Annexe 3: rhéologie oscillatoire aux faibles déformations	244
Annexe 4: Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)	248
Annexe 5 : Microscopie Electronique en Transmission (MET) – mode image	250
Annexe 6 : Analyse de texture d’image par la méthode de cooccurrence	254
Annexe 7 : Résonance magnétique nucléaire ¹H pour le séquençage de l’alginate	256
Références bibliographiques	258
Point final	272
Résumé/Abstract	275

Liste des abréviations

7S ; 11S : coefficient de Svedberg déterminés respectivement pour les vicilines et légumine de globulines végétales (dont le pois).

A_{Pr-Pr} ; A_{Ps-Ps} : coefficient du viriel d'interaction entre protéine et solvant et entre polyoside et solvant

A_{Pr-Ps} : coefficient du viriel d'interaction croisée protéine-polyoside

ACP (=PCA) : analyse en composantes principales (= principal component analysis)

AED (=DSC) : analyse enthalpique différentielle (dynamic scanning calorimetry)

Alg : alginate

CC: carbonate de calcium

DS (=SD) : décomposition spinodale

DTT : dithiothreitol

G : guluronate (monomère de l'alginate)

G_p : point gel ; ici valeur de pH correspondante à l'instant (min) où la transition sol-gel a été détectée par le viscoélastimètre (lorsque $\tan \delta = 1$)

G' : module élastique (ou de stockage)

G'' : module de perte ou visqueux

G' ; G'' : modules viscoélastiques mesurés par rhéologie dynamique aux faibles déformations

GDL : glucono- δ -lactone

GDN : chlorure de guanidium

I : force ionique

Leg : fraction enrichie de légumine de pois

M : mannuronate (monomère de l'alginate)

MCBL : microscopie confocale à balayage laser (= CLSM : confocal laser scanning microscopy)

MET : microscopie électronique à transmission (=TEM : transmission electron microscopy)

MS : matière sèche

NC : nucléation et croissance (=NG : nucleation and growth)

Liste des abréviations

NEM : N-ethylmaleimide

PA_{1;2} : albumine de pois 1 ; 2 (pea albumin 1 ; 2)

PATAg : acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent

pI : point isoélectrique

PP : protéines globulaires de pois

PPA : protéines globulaires de pois agrégées (=APP : aggregated globular pea proteins)

PPA₀: solution mère de PPA dans 0,1 M NaCl, pH 7,2.

PPn : protéines globulaires de pois « natives » ou « faiblement dénaturées » en solution extraites de PPP.

PPn₀: solution mère de PPn dans 0,1 M NaCl, pH 7,2.

PPN : protéines globulaires de pois « natives » ou « faiblement dénaturées » en solution (=LPP : low-denatured globular pea proteins) extraites de PPI

PPN₀: solution mère de PPN dans 0,1 M NaCl, pH 7,2

PPI : isolat de protéines globulaires de pois extraites de l'isolat commercial Nutralys S85M

PPP : isolat de protéines globulaires de pois extraites de graines de pois du même lot que l'isolat industriel utilisé

Pr : protéine

Ps : polyside

R_c : rayon de la particule colloïdale

R_g : rayon de gyration

R_p : rayon de giration du polymère assimilé à une sphère

SAB : sérum albumine bovine (= BSA : bovine serum albumin)

S⁻/SS : échanges de sulfhydryl/ pont disulfures

SDS : sodium dodécyl sulfate

SDS PAGE : électrophorèse SDS sur gel de polyacrylamide (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

T : température

tan δ : rapport G''/G'

Liste des abréviations

T_d : température de thermo-dénaturation (AED)

T_{onset} : température de début de dénaturation (AED)

Vic : fraction enrichie en viciline 7S de pois

ΔG : variation d'énergie libre du mélange

ΔH : variation d'enthalpie du mélange

ΔH_d : enthalpie de dénaturation (AED)

ΔS : variation d'entropie du mélange

$\chi_{A(B)-S}$: coefficient de Flory-Huggins polymère A (ou B) -solvant

χ_{A-B} : coefficient d'interaction croisée entre polymères A-B

Liste des communications/publications réalisées lors de cette étude

- Posters :
 - (i) « Phase separation, microstructure and rheology of a pea proteins - sodium alginate – water ternary system”. Congrès “Biopolymères 2010”, 1-3/12/2010, Le Croisic, France.
 - (ii) “Phase separation of a naturally mixed pea globulins – sodium alginate – water ternary system: microstructure analysis and rheological behavior”. Congrès “ICEF 2011”, 22-26 mai 2011, Athènes, Grèce.

- Communication orale :

“Protein aggregation induced by phase separation in pea proteins – sodium alginate aqueous mixtures: microstructure and rheological features”. Congrès “EFFOST 2011”, 9-11/11/2011, Berlin, Allemagne.

- Travaux publiés (apparaissent sous les noms respectifs de **P1** & **P2** dans la suite):
 - (i) Mession, J.-L., Assifaoui, A., Lafarge, C., Saurel, R. & Cayot, P. (2012_a). Protein aggregation induced by phase separation in a pea proteins-sodium alginate-water ternary system. *Food Hydrocolloids*, 28, 333-343. (**P1**)
 - (ii) Mession, J.-L., Assifaoui, A., Lafarge, C., Saurel, R. & Cayot, P. (2012_b). Effect of pea proteins extraction and vicilin/legumin fractionation on the phase behavior in admixture with alginate. *Food Hydrocolloids*, 29, 335-346. (**P2**)

- Manuscrits pouvant faire l’objet d’une publication (présentés tels quels en **sous-parties 5.1.2** et **5.2.2** du présent document de thèse) :
 - (i) Protein transient gelation in phase-separating pea globulin aggregates- alginate aqueous mixtures.
 - (ii) Cold-set gelation of a Pea Proteins – Sodium Alginate aqueous system by *in situ* release of calcium cations.

Introduction

Un aliment est un biomatériau, mélange complexe de plusieurs ingrédients en association avec des additifs (agents de texture, stabilisants ...) dans lesquels l'eau ou des gaz ont été incorporés lors de sa fabrication. Les constituants qui vont déterminer la structure macroscopique de l'aliment sont principalement des protéines, des polysides (plus génériquement des glucides), des lipides et des sels. En plus des considérations nutritives, le choix des ingrédients/additifs et leur proportion relative déterminent la structure finale de l'aliment, ainsi que sa conservation dans le temps. Les aliments offrent une grande variété de structures ; émulsions simple ou multiple (H/E, E/H, voire même E/E), mousses foisonnées, gels. La multiplicité et la variété des constituants ainsi que les fonctionnalités qu'ils présentent permettent d'obtenir un niveau de structuration varié et complexe, telles que des mousses émulsionnées et/ou gélifiées, ou encore des gels émulsionnés.

La structuration des systèmes alimentaires est régie par les interactions entre les composés mis en présence. La stabilisation de cette structure tridimensionnelle dans le temps est difficile à mettre en œuvre du fait de l'entrecroisement des propriétés hydrophiles (polysides) ou amphiphiles (protéines) mises en jeu. Le procédé de préparation de l'aliment (en somme le protocole de transformation à appliquer à la formulation retenue), permet de modifier les fonctionnalités des constituants. ; citons des altérations chimiques (acidification, chauffage, ajout de sels...) et physiques (agitation, contraintes mécaniques, introduction de gaz). Evidemment un constituant ne présentera pas les mêmes fonctionnalités s'il est seul ou en mélange. La compréhension des propriétés physicochimiques d'un aliment passe forcément par l'étude de systèmes simples, et d'incrémenter par la suite leur complexité. Pour cela, les systèmes protéine-polyside sont récurrents, notamment dans les produits de l'industrie laitière (Syrbe, Fernandes, Dannenberg, Bauer, & Klostermeyer, 1998).

La notion de texture alimentaire se rapporte souvent aux propriétés de larges déformations ressenties par le consommateur, influençant les caractéristiques sensorielles de l'aliment (Montejano, Hamann, & Lanier, 1995 ; Rosenthal, 1999). Le contrôle de ces relations structure-fonction est d'un intérêt capital dans l'élaboration d'un aliment complexe, afin qu'il puisse représenter un bénéfice nutritionnel tout en étant satisfaisant sur un plan organoleptique.

Introduction

Protéines et polysides sont des constituants clé dans la plupart des aliments, car ils lui confèrent stabilité et grande diversité de textures. En particulier, les protéines globulaires peuvent présenter des capacités d'agent foisonnant, émulsifiant et gélifiant. Le pré-requis à une gélification consiste en une dénaturation thermique qui assure l'ouverture et le déploiement de la structure compacte des globulines. Dans des conditions prédéfinies empiriquement, celles-ci peuvent s'agréger en un réseau, à l'origine de gels aux caractéristiques macroscopiques variées (Clark, Kavanagh, & Ross-Murphy, 2001). Bien documenté pour ce qui est des protéines de lactosérum comme la β -lactoglobuline, le choix d'autres sources protéiques (végétales) nécessite la redéfinition des traitements thermiques en combinaison avec les paramètres physicochimiques du solvant (pH, force ionique, température...).

Le choix des globulines de pois a été arrêté. Assez peu d'études récentes portent sur les aptitudes à la gélification de celles-ci, comparé au soja (O'Kane et al., 2004_{a,b,c}, 2005; (Shand, Pietrasik, & Wanasundara, 2007 ; Sun & Arntfield, 2010). Selon les différents protocoles appliqués, ces auteurs ne s'accordent pas sur la qualité des protéines extraites et qui conditionnent par la suite leur gélification. Ajoutons à cela l'hétérogénéité au sens large des protéines de pois qui pose des difficultés quant à leur caractérisation (Casey, Sharman, Wright, Bacon, & Guldager, 1982; Tzitzikas, Vincken, de Groot, Gruppen, & Visser, 2006). Ainsi, le choix de la matière première et du type d'extraction des globulines vont déterminer d'une part leur solubilité, et d'autre part leur stabilité thermique.

Le pois constitue une excellente source de protéines, sucres complexes (amidon...), fibres et minéraux. En dépit d'un coût moindre que les protéines laitières, les protéines de légumineuses sont encore peu utilisées dans l'alimentation humaine, en raison de nombreux facteurs antinutritionnels/anti-physiologiques qu'elles peuvent véhiculer (Fredrikson, Biot, Alming, Carlsson, & Sandberg, 2001 ; Nikolopoulou, Grigorakis, Stasini, Alexis, & Iliadis, 2007 ; Wang, Warkentin, Briggs, Oomah, Campbell, & Woods, 1998). Ces facteurs réduisent d'une manière générale la digestibilité des protéines végétales, dont le soja, si bien que les procédés de préparation et de cuisson affectent celle-ci (Alonso, Orue, & Marzo ; 1998 ; Rehman & Shah, 2005). Parmi ceux-ci, les phytates sont mis en cause dans la réduction de la biodisponibilité du fer et du zinc chez l'homme (Sandberg, Brune, Carlsson, & Hallberg, 1999, Steiner, Mosenthin, Zimmermann, Greiner, & Roth, 1980), et leur élimination dans les extraits de protéines végétales est problématique (Fredrikson et al., 2001 ; Fuhrmeister &

Introduction

Meuser, 2003). Cela pose d'emblée le problème de l'extraction des globulines de pois tout en limitant l'apport de ces divers contaminants.

Une autre limite d'application des globulines végétales est leur structure particulièrement compacte, nécessitant des températures élevées ($\geq 80^{\circ}\text{C}$) afin de les dénaturer et de les fonctionnaliser (Kimura, Fukuda, Zhang, Motoyama, Maruyama, & Utsumi, 2008 ; Marcone, Kakuda & Yada, 1998_{a-c}). Les données préexistantes insistent sur la variabilité structurelle des globulines de pois, compliquant grandement l'optimisation des paramètres de gélification. De plus, les gels de globulines de pois seraient globalement plus faibles que ceux à partir du soja (O'Kane et al., 2005 ; Shand et al., 2007 ; Sun et al., 2010).

L'addition d'un polyoside de haute masse moléculaire à une solution protéique précédant l'étape de chauffage modifie généralement la gélification de la protéine. Selon la composition initiale en protéine et en polyoside, plusieurs topologies de gels ont été décrites en rapport avec leurs propriétés rhéologiques (Tolstoguzov, 1995). Le plus souvent, seule la protéine gélifie par chauffage du mélange. En revanche, des co-gels (ou gels mixtes) peuvent être obtenus lorsque le polyoside peut gélifier à son tour. Il s'agit du cas où deux réseaux peuvent se former et coexister, aussi ce cas complexe est le moins documenté (Beaulieu et al., 2001 ; Donato et al., 2005 ; Turgeon et al., 2001). Il s'agit donc pour les formulateurs de tirer profit des interactions protéine-polyoside, en l'occurrence d'effets de synergie sur le plan élasticité des gels multi-composés. Un polyoside anionique, l'alginate de sodium, a été retenu dans le cadre de notre étude pour sa capacité à gélifier par ajout de cations bivalents (calcium). Cette capacité singulière de l'alginate a d'ailleurs généralisé son utilisation dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires (Nussinovitch, 1996).

Du fait de leurs différences de structure, de masse moléculaire, de conformation de chaîne et de taille, protéine et polyoside mis en présence sont incompatibles. Ce phénomène génère une séparation de phase dite ségrégative, où chaque biopolymère tend à s'entourer de biopolymères du même type. Ainsi un mélange initial protéine-polyoside anionique se résoudra à l'équilibre thermodynamique en deux phases liquides coexistantes, enrichies chacune en un biopolymère et appauvries en l'autre. Cela se produit lorsque les deux biopolymères sont tous deux chargés négativement, inhibant leur complexation (Grinberg et Tolstoguzov, 1997). De tels systèmes incompatibles mettent ainsi en exergue une large gamme de microstructures que l'on ne pourrait pas obtenir avec une solution de biopolymère seul (Doublier, Garnier, Renard, & Sanchez, 2000). La gélification d'un tel système

Introduction

naturellement instable, éviterait son déphasage macroscopique. De ce fait, la structure finale du gel dépend non seulement des considérations topologiques évoquées ci-dessus, mais aussi de la compétition cinétique entre séparation de phase et gélification (Norton et al., 2001). Une formulation réussie dépendra de la prise en compte de ces phénomènes interdépendant (Turgeon et al., 2001).

Ce travail présente un système ternaire aqueux globulines de pois-alginate, non décrit précédemment. En d'autres termes, une étude bibliographique se proposera dans un premier temps de discuter les bases et acquis sur (i) les aspects structuraux et physicochimiques des globulines de pois (du moins des protéines végétales) et notamment leurs aptitudes à la gélification. Le même schéma descriptif sera appliqué aux alginate. Puis dans un deuxième temps seront exposés (ii) les concepts thermodynamiques des mélanges aqueux incompatibles protéine-polyoside, illustrés d'exemples de systèmes proches du notre. Enfin dans un troisième temps, (iii) les procédés de gélification de ces mélanges ternaires et la caractérisation des gels multi-composés obtenus seront abordés.

Passé cet état de l'art assez exhaustif, nous validerons la méthodologie d'extraction retenue pour les globulines de pois. Puis nous nous attarderons sur l'étude de notre système à l'état liquide, en utilisant soit des protéines « natives » (ou faiblement dénaturées par le procédé d'extraction), soit des protéines pré-dénaturées. Finalement, la gélification en masse des deux systèmes globulines natives ou pré-dénaturées-alginate sera opérée à froid en présence de calcium. A l'état liquide puis gélifié, les caractérisations structurales des mélanges s'effectueront à différentes échelles d'observation.

1. Etudes bibliographiques

« A quoi ça sert de chercher, on a déjà tout inventé ! »

Discussion entre deux hommes préhistoriques manipulant des silex

(D'après une caricature sur le progrès, dans un ancien numéro de Science & Vie)

1.1. Propriétés structurales et physicochimiques des biopolymères utilisés

1.1.1. Les globulines de pois

1.1.1.1. Niveau de structure

Les protéines sont des édifices macromoléculaires complexes à au moins trois niveaux de structure : primaire (séquence), secondaire (conformations locales) et tertiaire (agencement des structures secondaires dans l'espace). Une structure quaternaire concerne les protéines oligomériques, comme les globulines, formées de plusieurs sous-unités polypeptidiques (monomères). Les paramètres du solvant (pH, force ionique I, température T influent directement sur la conformation spatiale des protéines. Des réorganisations plus ou moins profondes impliquant plusieurs niveaux de structure, voire même des dissociations/associations des sous-unités sont à prévoir selon des modifications environnementales induites. Dès lors que celles-ci sont connues et maîtrisées, il serait plus aisé de moduler les propriétés texturantes des protéines globulaires.

1.1.1.2. Composition, rôle biologique des protéines de légumineuses ; le cas du pois

Les globulines végétales présentent dans leur ensemble de nombreuses propriétés techno-fonctionnelles potentielles, variables selon la source protéique et le cultivar considérés (Kimura et al., 2008). Naturellement sous forme d'un mélange complexe, les protéines végétales sont couramment classifiées selon leur coefficient de sédimentation S en rapport avec leur masse moléculaire (Danielson, 1949 ; Svedberg, Pedersen, & Bauer, 1940). Parmi elles, on distingue très majoritairement les globulines 7S/11S.

Les légumineuses peuvent contenir entre 18 et 32% de protéines sur une base matière sèche (MS). Cette fraction constitue le deuxième compartiment de la graine de pois sèche, le premier étant l'amidon ($\approx 50\%$), puis les fibres ($\approx 20\%$) et les matières grasses ($\approx 2,5\%$), sur une base MS (Tzitzikas et al., 2006). La fraction azotée contenue dans les graines de pois est principalement d'origine protéique ($\approx 85\%$). Comme dans la plupart des dicotylédones, entre 65 et 80% de cet azote protéique est contenu dans la fraction globulines, le reste provient des albumines 2S (Guéguen, 1983 ; Kimura et al., 2008 ; Tzitzikas et al., 2006).

1. Etudes bibliographiques

Suivant la méthodologie de fractionnement développée par Osborne & Campbell (1898), les globulines sont qualifiées d'extractibles en solutions salines, alors que les albumines sont solubles dans l'eau. Danielson (1949) a séparé des protéines globulaires par ultracentrifugation et a pu attribuer à chaque fraction, viciline et légumine, un coefficient S et une masse molaire pour la fraction 7S de 186 kDa et pour 11S de 331 kDa, respectivement. Quant à la fraction albumine 2S, elle désigne en réalité des protéines très hétérogènes en composition et de faibles masses moléculaires, comprises entre ≈ 5 et ≈ 80 kDa. On peut y adjoindre des enzymes ou des répresseurs d'activité enzymatique qui interviennent lors de la germination de la plantule, tels des inhibiteurs de protéases ou d'amylases, des lectines, ou des lipoxygénases. Il est à noter que certaines albumines comme la PA₁ (pea albumin 1, ≈ 11 kDa) sont riches en acide aminé cystéine et peuvent constituer à part entière une réserve en soufre pour la plantule en développement (Schroeder, 1984). Une autre albumine, la PA₂ (≈ 26 kDa) a été identifiée mais n'a pas révélé un contenu en soufre particulièrement élevé. Son rôle biologique n'a pas été clairement établi.

Les globulines sont des protéines de réserve; stockées dans les corpuscules protéiques, elles fournissent azote, carbone et soufre à la plantule lors de sa germination (Tzitzikas et al., 2006). Les globulines sont oligomériques et présentent une grande hétérogénéité de structure typique des protéines végétales.

On distingue deux grands groupes: la fraction légumine 11S et la fraction viciline/convicine 7S. La composition en ces deux fractions et leur proportion relative est affectée principalement par des facteurs génétiques et modérément par des modifications de l'environnement. A partir de l'étude de plusieurs génotypes de pois distincts, Casey et al., (1982) ont évalué un rapport viciline/légumine fluctuant entre 0,67 et 5, rapport qui a été resserré entre 2 et 4 par Tzitzikas et al. (2006). Il est à noter que les légumine 11S et vicilines 7S du pois auraient des séquences en acides aminés atteignant jusqu'à 70% de similitudes avec les glycinines 11S et conglycinines 7S du soja, respectivement (Kimura et al., 2004).

1.1.1.3. Variabilité dans les globulines de légumineuse : origine génétique et conséquences dans la composition en polypeptides

Les premières études biochimiques consacrées à l'identification/purification de fractions légumine 11S et viciline/convicine 7S remontent à une trentaine d'années. La composition en polypeptides leur séquence, et les voies de biosynthèse *in vivo/in vitro* ont été

1. Etudes bibliographiques

abordés. La question de la grande variabilité des globulines du pois demeure récurrente. On pourrait penser que l'ambition de ces chercheurs à l'époque était la sélection de gènes codant pour des globulines de « meilleure qualité » nutritionnellement parlant, par exemple enrichies en méthionine (Casey, 1982 ; Gatehouse, Croy, & Boutler, 1984). Les globulines végétales, dont celles du pois, présentent chacune des structures quaternaires complexes, polydisperses en termes de taille, masse moléculaire, sous-unités constitutives. Pour s'en figurer, se référer à la **Figure 1.1**.

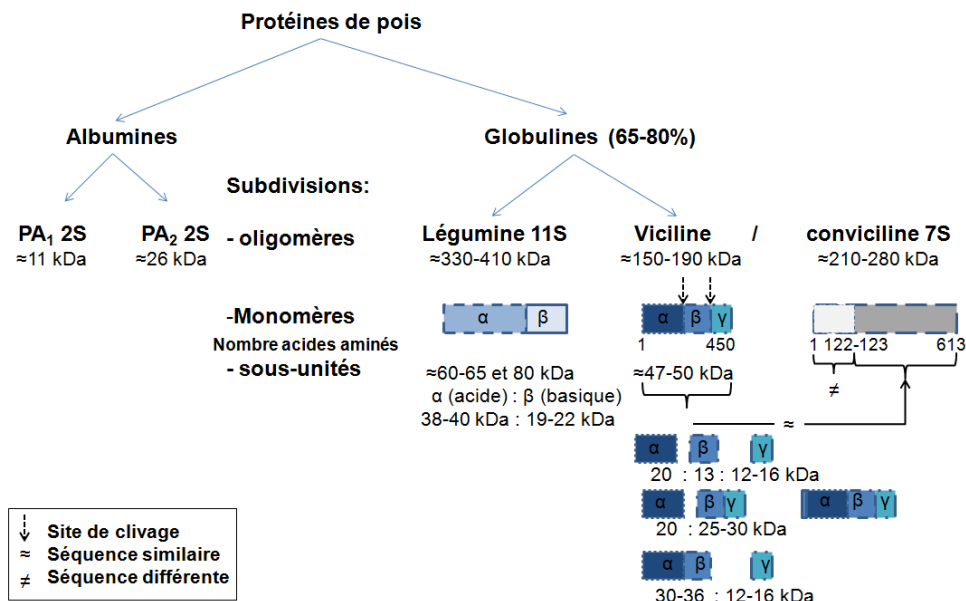


Figure 1.1 : Assemblage des sous-unités constitutives des globulines de pois 7S et 11S, et potentiels sites de clivage (d'après Croy et al., 1980 ; Gatehouse et al., 1979, 1981 ; Tzitzikas et al., 2006).

- **Les légumines 11S**

Les légumines ont une masse molaire de 330-410 kDa (Gatehouse, Croy, & Boutler, 1980 ; Marcone et al., 1998_{a-c}). Elles sont constituées de monomères de 60-65 kDa, qui s'assemblent en hexamère à des pH entre 7 et 9. Une légumine S a été recensée avec une masse moléculaire de 80 kDa (Matta, Gatehouse & Boutler, 1981). Chaque monomère de légumine est formé de deux polypeptides acide α et basique β de 38-40 kDa et 19-22 kDa, respectivement et liées par paires de manière covalente via un pont disulfure (Casey, 1979 ; Tzitzikas et al., 2006). Celles-ci présentent des points isoélectriques (pI) variables selon les auteurs ; α : 4,5-5,8 et β : 6,2-8,8. Les légumines se singularisent des vicilines/conviciline par leur contenu en acides aminés soufrés ; il a été recensé jusqu'à quatre méthionines et sept résidus cystéine pour chaque sous-unité α :β de ≈60 kDa de légumine, alors que les vicilines/conviciline seraient dépourvues d'acides aminés soufrés (Croy, Gatehouse, Tyler, &

1. Etudes bibliographiques

Boutler, 1980 ; Spencer, Chandler, Higgins, Inglis & Rubira, 1983). En comparaison, la glycine du soja contiendrait jusqu'à huit résidus cystéine (O'Kane et al., 2004). De plus, Chandler, Higgins, Randal, & Spencer (1983) ont démontré une diminution de la synthèse de légumine avoisinant les 80% dans un milieu déficient en soufre.

Les polypeptides α et β de plusieurs légumine de pois présentaient des séquences primaires homologues ; les différences se trouveraient principalement dans la séquence N-terminale (Casey, 1982). Un gène commun codant pour un précurseur de ≈ 60 kDa se serait dupliqué, puis des mutations seraient à l'origine de l'évolution indépendante de deux groupes de polypeptides constitutifs des sous-unités de la légumine. Concernant la biosynthèse, les polypeptides β seraient d'abord transférées via un peptide signal dans le réticulum endoplasmique, et s'associeraient en trimères. Une fois le peptide ôté, une enzyme vacuolaire procéderait à la liaison $\alpha:\beta$ via un pont disulfure (Tzitzikas et al., 2006). Les trimères de paires $\alpha:\beta$ s'assembleraient enfin en hexamère.

La structure très condensée des légumine serait liée à sa faible hydratation dans la graine. La glycosylation et/ou la phosphorylation *in vivo* des globulines de légumineuses serait un moyen d'augmenter son caractère hydrophile par la présence de groupements polaires en surface (Marcone, 1999). Plietz, Damaschum, Muller, & Schwenke (1983) avaient suggéré que l'ensemble des globulines 11S de dicotylédones avaient des structures quaternaires très similaires ; celles-ci adopteraient un modèle de structure trigonale bipyramidale. Un tel arrangement justifierait l'orientation des polypeptides α , plutôt hydrophiles et β , plutôt hydrophobes vers l'extérieur et vers l'intérieur de la protéine oligomérique, respectivement (**Figure 1.2**). Ce modèle semblerait plus adapté que celui de deux hexagones empilés (Marcone et al., 1998_b).

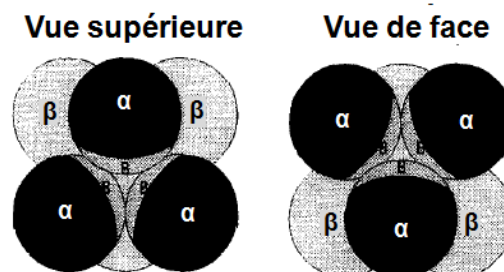


Figure 1.2 : Modèle de structure quaternaire trigonale bipyramidale envisageable pour les globulines 11S de dicotylédones. Chaque sphère représente un polypeptide acide α ou basique β , constitutifs des sous-unités des légumine. (d'après Marcone et al., 1998_b).

1. Etudes bibliographiques

L'analogue des légumineuses chez le soja sont les glycinines 11S. Par cristallographie aux rayons X et modélisation moléculaire, Adachi, Takenaka, Gidamis, Mikami, & Utsumi (2001) ont montré que les trimères de proglycinine (protomère) avaient une structure similaire aux vicilines 7S type *Phasoléine* du haricot rouge. Les sous-unités seraient constituées de 25 brins et 5 hélices, repliés dans un large feuillet β enroulé sur lui-même (structure assimilable à un barril), ainsi que deux domaines hélicoïdaux étendus (**Figure 1.3a**). Chaque sous-unité posséderait deux ponts disulfures, dont un serait intra-chaîne et le deuxième inter-chaînes. Ce dernier serait impliqué dans la liaison d'une sous-unité acide et d'une basique constitutives des sous-unités. Ceux-ci contribueraient à la stabilité structurelle et repliée des globulines. Pour ce qui est de l'assemblage en hexamères matures, deux trimères se superposeraient au niveau de leur face IE, présentant une plus grande hydrophobicité de surface que la face IA (**Figure 1.3b**). Les interactions hydrophobes entre sous-unités auraient un rôle prépondérant par rapport aux liaisons hydrogènes. Enfin, il est à noter que les glycinines 11S et Phasoléines 7S possédaient des séquences en acides aminés très proches au niveau de la région C-terminale. La conservation de ces structures similaires d'une espèce à l'autre confirmerait bien l'existence d'un gène ancestral commun aux globulines 11S et 7S.

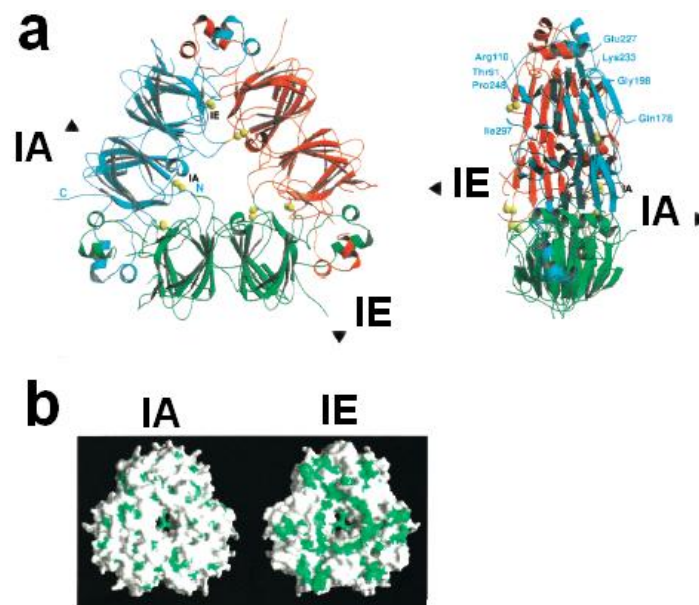


Figure 1.3 : conformation spatiale obtenue par cristallographie aux rayons X et modélisation moléculaire de la proglycinine du soja. Les sous-unités constitutives du protomère figurent en rouge, cyan et vert. Les ponts disulfures sont représentés par des sphères jaunes. Les deux faces de la proglycinine sont respectivement nommées IA et IE. La région C terminale est en périphérie, alors que la région N terminale est localisée sur la face IA à l'intérieur du protomère proche de son centre (a) Vue supérieure et à 180°C suivant un axe vertical. (b) Localisation des acides aminés hydrophobes de surface selon les faces IA ou IE (d'après Adachi et al., 2001).

1. Etudes bibliographiques

Dans une étude qui se penchait entre autres sur la prolégumine de pois, Tandang-Silvas et al. (2010) ont rapporté une homologie de structure primaire de 63% avec la proglycinine. Pour ce qui est des structures secondaires et tertiaires, 5 régions variables (non résolues du fait de leur structure désordonnée dans les protéines cristallisées) ont été recensées parmi les protomères de légumine de différentes espèces végétales, telles la procruciférine de colza ou le protomère 11S de potiron). Cette variabilité locale peut expliquer les différences de flexibilité de chaîne et d'exposition des groupements hydrophobes. Ainsi l'émergence de plus ou moins d'interactions hydrophobes aliphatiques étaient davantage polarisables au contact de l'eau et que cet effet augmentait avec la température. Lorsque la légumine est mature sous forme d'hexamère, l'assemblage des deux trimères réduisait par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes faisait intervenir de nouvelles interactions non-covalentes, nécessitant un apport d'énergie supplémentaire et donc une élévation de la température de thermodénaturation par rapport au protomère.

- **Les vicilines 7S**

Malgré des masses molaires plus faibles, le groupe des vicilines 7S apparaît plus hétérogène et leur structure n'est pas clairement définie. Les vicilines sont trimériques avec une masse molaire fluctuant de $\approx 150-190$ kDa ; les différentes sous-unités proviennent d'un même précurseur de 47-50 kDa et leur liaison ne fait pas intervenir de ponts disulfures (Gatehouse, Croy, Morton, Tyler, & Boutler, 1982) (**Figure 1.1**). Les vicilines sont donc principalement constituées de trois sous-unités de ≈ 50 kDa. D'autres polypeptides, plus petits et non-séparables, ont été recensés, possédant des masses molaires de 33, 19, 16.5, 12.5 kDa (Gatehouse, Lycett, Croy, & Boulter, 1982). Ces sous-unités résulteraient de protéolyses *in vivo* du précurseur de ≈ 50 kDa, ne modifiant pas fondamentalement la masse molaire ou l'hétérogénéité de charge ; les polypeptides clivés restent ainsi associés. Les sites possibles de clivage du précurseur de ≈ 50 kDa sont au nombre de deux, dénommés $\alpha : \beta$ et $\beta : \gamma$ (Matta et al., 1981 ; Tzitzikas et al., 2006). Lorsque les clivages se produisent sur les deux sites, des fragments de 20 kDa (α), 13 kDa (β), 12-16 kDa (γ) sont obtenus. Lorsque le clivage se produit entre α et β , les fragments résultants sont de 20 kDa (α) et 25-30 kDa ($\beta + \gamma$), alors qu'un clivage entre β et γ donne des fragments de 30-36 kDa ($\alpha + \beta$) et 12-16 kDa (γ) (Gatehouse et al., 1982). Une glycosylation peut se produire par la suite au niveau de la chaîne C-terminale du fragment γ (Spencer et al., 1983). Les oses seraient principalement des dérivés du glucose ou du mannose (Davey & Dudman, 1979).

1. Etudes bibliographiques

La biosynthèse des vicilines est similaire à celle des légumineuses, sans l'assemblage final en hexamère (Gatehouse, Croy, & Boutler, 1984).

- **Les convicilines 7S**

Les convicilines 7S seraient une troisième famille de globulines de pois. Les convicilines sont constituées de sous-unités d'environ ≈ 71 kDa très probablement associés en trimères, de masse molaire de $\approx 210-280$ kDa (Croy et al., 1980). Des résidus cystéine et méthionine ont été identifiés par sous-unités de convicine. Ces dernières ont une composition globale en acides aminés homologues à celle des vicilines, ainsi qu'une chaîne N-terminale particulièrement étendue et chargée de 122 à 166 résidus d'acides aminés (Tzitzikas et al., 2006). Contrairement aux vicilines, il n'a pas été reporté de clivage post-synthèse (à l'exception de la perte du peptide signal), ou de glycosylation notable (Newbiggin, de Lumen, Chandler, Gould, Blagrove, March, Kortt & Higgins, 1990). Les deux allèles codants pour les convicilines sont distincts de ceux des vicilines.

1.1.1.4. Les acides aminés des globulines de pois

Le **Tableau A.1 de l'Annexe A.1** présente les compositions moyennes en acides aminés, tirées de la littérature, pour les deux fractions séparées de globulines de pois comparées à celles du soja : légumineuses 11S/vicilines 7S et glycine 11S/conglycinine 7S, respectivement (Derbshyre, Wright, & Boutler, 1976 ; Emmert & Baker, 1995 ; Jackson, Boutler, & Thurman, 1969 ; Savage & Deo, 1989 ; O'Kane et al. 2004_d ; Rangel et al., 2003 ; Riblett, Herald, Schmidt, & Tilley, 2001). Il apparaît que les globulines de légumineuses ont une composition similaire en acides aminés (Boye et al., 2010) ; celle-ci est particulièrement riche en acides aminés essentiels : lysine, isoleucine, acides glutamique et aspartique, arginine (Savage et al., 1989). Par contre, les globulines de légumineuses sont déficientes en tryptophane et ont un contenu pauvre en résidus d'acides aminés soufrés, ce qui les oppose aux protéines de soja. Il y a en outre controverse sur la présence ou non de résidus soufrés dans les vicilines. Il semblerait que ce contenu soit très variable d'une variété/cultivar à l'autre, tout en restant très faible (Derbshyre et al., 1976).

1.1.1.5. Méthodes d'extraction

Avant même de considérer les propriétés physicochimiques des protéines globulaires de légumineuses, leur mode d'extraction est primordial. Différentes méthodologies permettent l'obtention d'isolats protéiques de qualité variable, dont dépendront leurs propriétés

1. Etudes bibliographiques

physicochimiques futures. En particulier, les auteurs semblent en désaccord sur la manière d'isoler les globulines de pois tout en préservant leur structure native (Boye et al., 2010 ; Guéguen, 1983 ; Fredrikson et al. 2001 ; Fuhrmeister et al., 2003 ; Shand et al., 2007). La **Figure 1.4** résume les procédures courantes d'extraction des globulines de pois.

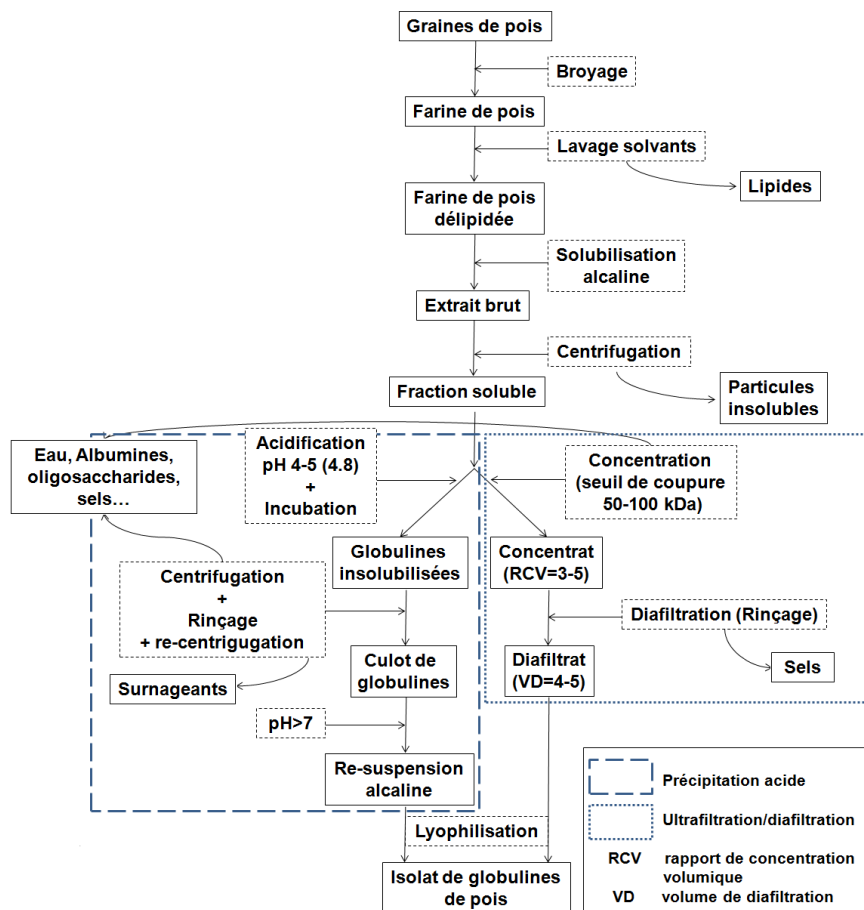


Figure 1.4 : Extraction des globulines de pois (synthèse D'après Boye et al., 2010 ; Guéguen et al., 1983 ; Fredrikson et al. 2001 ; Fuhrmeister et al., 2003).

- **Des graines comme matière première**

Le broyage mécanique pose le problème des micro-échauffements lors du contact lame-graine, probablement préjudiciable à la structure native des globulines (Koyoro & Powers, 1987). D'autres auteurs préconisent en conséquence un cryo-broyage (O'Kane et al., 2004_{a-c}). Industriellement, le broyage des pois secs ou humides se fait à température ambiante sur rouleaux (Fuhrmeister et al., 2003). Un trempage au préalable permettrait d'éliminer certains facteurs antinutritionnels, type oligosaccharides (Boye et al., 2010 ; Fredrikson et al.,

1. Etudes bibliographiques

2001 ; Guéguen, 1983). Néanmoins, des globulines fortement compactées à l'état sec seraient moins sensibles à des dénaturations mécaniques.

- **Une délipidation au préalable ?**

Les graines de pois ont un contenu en matières grasses inférieur à celui du soja. Il a été reporté des contenus en matières grasses dans des farines de soja et de pois d'environ 5% et de 1 à 2% en base MS, respectivement (Fuhrmeister et al., 2003 ; Shand et al., 2007). Pour une extraction industrielle de globulines à usage alimentaire, la délipidation par solvants (éther de pétrole...) sur la farine sèche n'est pas viable économiquement et pose le problème des résidus de solvants dans le produit fini. Par la suite, extraire les globulines à partir d'une farine brute pose le problème de la contamination de la fraction protéique par des lipides ; les interactions lipides-protéines sont dues à la nature de la matière grasse et de leur localisation (Shand et al., 2007). Les lipides associés modifieraient la solubilité dans l'eau et augmenteraient la turbidité des suspensions protéiques, comme il l'a été décrit pour des extraits protéiques de soja (Li, Li, Hua, Qiu, Yang & Cui, 2007).

- **Précipitation acide**

L'extraction des globulines de pois commence par une solubilisation de la poudre dans un tampon alcalin (pH 7-8), puis d'une précipitation au pH de minimum de solubilité des protéines, de l'ordre de 4,5-4,8 (Koyoro et al., 1987 ; Shand et al., 2007). Dans ce domaine de pH, les interactions entre oligosaccharides du pois et protéines sont réduites (Guéguen, 1983). Cela dit, la solubilité des globulines peut être altérée par le fait qu'elles soient glycosylées ou phosphorylées (Marcone, 1999). La présence de phytates ou d'oses intimement liés à la protéine modifieraient leur charge globale de surface, altérant leur solubilité selon le pH (Fuhrmeister et al., 2003 ; Pedrosa, Trisciuzzi & Ferreira, 1997). L'acidification de l'extrait brut doit s'opérer progressivement, sans chauffage. Fuhrmeister et al. (2003) ont rapporté qu'une précipitation acide et à chaud des globulines de pois ridées était très préjudiciable à la qualité de l'isolat final. Une acidification trop abrupte serait à l'origine de dénaturations ou de dissociations partielles des globulines. Les globulines extraites sont ressolubilisées à pH alcalin (>7) par ajout d'une solution de soude. La suspension protéique est enfin séchée ; l'atomisation est la méthode industrielle la plus employée, malgré des températures élevées potentiellement dénaturantes. Une lyophilisation est préférable à l'échelle du laboratoire.

- **Ultrafiltration**

1. Etudes bibliographiques

Alternativement, la séparation par membrane permet d'extraire les globulines de pois (Fredrikson et al., 2001 ; Fuhrmeister et al., 2003 ; Guéguen, 1983). L'extrait brut de protéines (volume V_0) de pois solubilisées à pH alcalin est mis en circulation par un système de pompage et le flux sous pression passe tangentiellement sur un filtre. La séparation du matériel protéique avec les autres constituants s'opère sur la base des masses moléculaires ; la membrane est caractérisée par un seuil de coupure - fixé à 50 ou 100 kDa le plus souvent – les globulines sont retenues alors que les plus petites molécules (oligosaccharides, sels...) sont éliminées dans le filtrat. Le volume d'extrait protéique est réduit jusqu'à un volume de concentrât (ou retentât) V_{UF} . Cette première étape est caractérisée par le Rapport de Concentration Volumique, ou RCV (**Equation (1.1)**) :

$$RCV = \frac{V_0}{V_{UF}} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

Une deuxième étape dite de diafiltration consiste en un lavage du concentrât par un volume d'eau V_E ajouté à un même débit que celui du filtrat. Cette étape est caractérisée par le Volume Diafiltraté VD (**Equation (1.2)**) :

$$VD = \frac{V_E}{V_{UF}} \quad (\text{Eq. 1.2})$$

Au cours de la diafiltration, les interactions protéines-sels sont réduites. Ce procédé est un moyen de dessaler les solutions protéiques. Sous certaines conditions, les isolats protéiques de pois (ou de soja) préparés par cette méthodologie montrent des contenus moindres en oligosaccharides, en phytates et en sels par rapport à des isolats protéiques préparées par solubilisation alcaline/précipitation acide (Fredrikson et al., 2001 ; Fuhrmeister et al., 2003).

L'efficacité de la séparation entre matériel protéique et non protéique est affectée par le débit de retentât, le type de membrane, son seuil de coupure, sa surface, le temps de filtration, la valeur du RCV (Boye et al., 2010). En outre, les rendements et la qualité des protéines extraites (faiblement dénaturées par l'extraction) sont liés au temps de filtration, à la température, à la pression du retentât en entrée, au degré de RCV et de VD. Le problème de colmatage de la membrane rencontré avec des régentats concentrés par des temps de filtration longs résulte en des rendements de récupération des globulines de l'ordre de 50-70%. Un temps long de mise au point est nécessaire afin de trouver un compromis entre tous ces paramètres.

1. Etudes bibliographiques

- **Le fractionnement des globulines de pois**

Etant donné l'hétérogénéité des globulines de pois, envisager une utilisation des globulines de pois comme texturant alimentaire impose au préalable une purification en quantités suffisantes des légumineuses 11S et vicilines 7S, afin d'en comprendre leurs fonctionnalités une fois prises séparément. Faisant écho aux travaux de biochimie évoqués précédemment, il s'agissait de déterminer quels cultivars de pois enrichis en telle ou telle globuline seraient préférables pour l'alimentation humaine, considérant à la fois des aspects nutritionnels et fonctionnels. Les protocoles consistent en une extraction des globulines par ultrafiltration ou précipitation, puis en un fractionnement des deux globulines par chromatographie échangeuse d'ions fonctionnant en gradient de force ionique (Guéguen, Vu & Schaeffer, 1984 ; O'Kane, 2004_{a-c}). Le principe de cette chromatographie repose sur la liaison de globulines chargées négativement à pH 7 à une amine quaternaire immobilisée sur des microbilles d'agarose (DEAE Sepharose[®] - phase stationnaire). L'augmentation progressive de la force ionique va éluer les fractions de globulines les unes après les autres. La viciline est éluee la première pour une concentration en NaCl modérée. Il est à noter que les vicilines se fixent de manière spécifique (ionique) et non-spécifique en fonction de la teneur en glycoprotéines. La légumine est éluee à une force ionique supérieure. Une fois le contenu des éluats identifiés par SDS-PAGE, les fractions sont collectées, concentrées, dessalées et lyophilisées.

1.1.1.6. Paramètres influençant la solubilité des globulines végétales/du pois

Séparément, les globulines 7S et 11S de légumineuses ont des propriétés technofonctionnelles distinctes (Kimura et al., 2008). Sont recherchées notamment chez les globulines des facultés à former/stabiliser des mousses, des émulsions et des gels. Celles-ci dépendent de leur solubilité, de leur stabilité thermique, de leur capacité à retenir l'eau et à se lier à la matière grasse (Boye et al., 2010). A signaler que des gels de globulines de pois présenteraient des caractéristiques variables d'un cultivar à l'autre (O'Kane et al., 2005).

Extrinsèquement, les variations des paramètres du solvant qui « baigne » les protéines globulaires peuvent modifier réversiblement/irréversiblement leur conformation de surface et interne. Leur stabilité en solution en dépend.

- **Notion de solubilité**

1. Etudes bibliographiques

Etant donné sa nature de macro-zwitterion, la solubilité des protéines dépend de la balance de charge de surface entre les groupements $\text{-NH}_3^+/\text{-NH}_2$ et $\text{-COOH}/\text{-COO}^-$, de pKa 9,8 et 4,2, respectivement. Par solubilité, on entend quantité de protéines solubilisées par rapport à la quantité de protéines introduites initialement. Celle-ci s'exprime le plus souvent en index de solubilité de l'azote (nitrogen solubility index, NSI %, m/m) suivant la méthode AACC 46-23 (1982). La solubilité des protéines sera liée au pH et à la composition/concentration en sels de la solution. L'environnement ionique du solvant conditionnera la distribution des acides aminés hydrophiles/hydrophobes sur les chaînes polypeptidiques exposées au solvant (Kimura et al., 2008). Une « bonne » solubilité va de pair avec des conditions optimales pour l'émulsification, le foisonnement et la gélification (Kinsella, 1979). Notons cependant que des traitements antérieurs (hautes températures) peuvent affecter cette solubilité.

- **Effet du pH**

A des faibles forces ioniques, la plupart des globulines de légumineuses montrent un domaine de minimum de solubilité à des pH compris entre 4 et 5,5 (Kimura et al., 2008). La solubilité augmente fortement de pH 6 à 7 et atteint de 70 à plus de 90% à des pH alcalins (7-9), et également à des pH acides inférieurs à 4 ; il a été montré pour des légumineuses de pois, qu'une dissociation des sous-unités $\alpha : \beta$ avait lieu sous un pH de 2,8 (Subirade, Guéguen & Schwenke, 1992). La solubilité de la glycinine 11S de soja adopte le même profil, se dissociant partiellement à des pH compris entre 3 et 3,8 (Lakemond, de Jongh, Hensing, Gruppen & Voragen, 2000).

- **Effet de la nature/composition en sels**

De manière similaire au pH, l'écrantage des charges de surface des protéines vont réduire les répulsions électrostatiques entre elles. Pour des ajouts modérés en sels, la solubilité des protéines peut être améliorée ; il s'agit là d'un effet de « salting-in », l'efficacité des sels suivent la série d'Hoffmeister (Damodaran, 1989). A l'opposé, de trop fortes concentrations en sels vont insolubiliser les protéines par effet de « salting-out » (Relkin, 1996). Pour des pH inférieurs à 5-6, Kimura et al. (2008) ont montré que la solubilité des globulines 11S de pois et de soja diminuait fortement à une force ionique $I=0,5$. La précipitation des globulines 7S se produisait à pH proche de 2. Dans les mêmes conditions, la solubilité de la glycinine 11S de soja diminuait de 80% à 30% de pH 4 à 2,5 (Lakemond et al., 2000). Ces mêmes auteurs ont établi qu'une diminution de la force ionique à pH 7.6 tendait à une plus grande exposition à la

1. Etudes bibliographiques

surface de la protéine des polypeptides β , plutôt hydrophobes, au dépend des polypeptides α , plutôt hydrophiles. Les interactions hydrophobes inter-protéines en seraient favorisées.

1.1.1.7. Dénaturation thermique et voies d'agrégation, pré-requis à la gélification

- **La perte induite de la structure native des protéines**

La structure native d'une protéine correspond à la configuration thermodynamiquement stable de ses niveaux de structure constitutifs, dans des conditions de solvants précises. Des dénaturations peuvent être provoquées par des modifications de l'environnement de la protéine : ajout de sels, de solvants, de tensioactifs, acidification, voire application de fortes pressions. Les dénaturations sont réversibles ou irréversibles ; dans le cas d'une dénaturation thermique, un chauffage et une incubation à une température supérieure à une température dite de thermo-dénaturation (T_d) entraîne des changements profonds dans les structures secondaires, tertiaires et quaternaires, résultant en une réorganisation spatiale des zones hydrophiles et hydrophobes de la protéine. De plus hautes valeurs de T_d et d'enthalpie de dénaturation ΔH_d reflètent une plus haute stabilité thermique et un niveau de structure plus ordonné, respectivement. La température joue de ce fait sur la stabilité thermodynamique de la protéine. La mise en évidence d'un pic endothermique par analyse enthalpique différentielle (AED) est significative d'un effet de dénaturation (voir **Annexe A.2**).

Un ajout modéré de NaCl réduit par écrantage des charges les répulsions inter- et intra-chaînes, ce qui tend à stabiliser la conformation de la protéine en solution et ainsi à élever la valeur de T_d (Sun et al., 2010). L'ajout de NaCl tend à renforcer les interactions hydrophobes inter- et intra-segments polypeptidiques. Cependant, des sels comme NaSCN ont un effet déstabilisant (chaotropique) sur les globulines de pois ; la forte charge des ions SCN^- augmente les répulsions et favorise la dénaturation à des valeurs de T_d plus basses (Sun & Arntfield. 2012).

Par chauffage et incubation à des températures élevées supérieures à T_d (>85-90°C pour des globulines végétales), le déploiement des chaînes polypeptidiques et l'exposition d'acides aminés précédemment enfouis dans le cœur hydrophobe à l'état natif vont affecter les interactions inter-protéines en solution (Kimura et al., 2008). Suite à la dénaturation, les protéines vont principalement s'associer via les groupements apolaires exposés de manière à minimiser les zones de contact avec l'eau (Bryant & McClemnts, 1998). Celles-ci peuvent s'établir à longue portée (0-10 nm). L'émergence d'interactions type électrostatique,

1. Etudes bibliographiques

physiques non-spécifiques (hydrophobe, hydrogène, van der Waals...) et/ou chimiques spécifiques (échange de ponts disulfures) vont mener à la formation d'agrégats protéiques stables, qui au-delà d'une concentration dite seuil de gélification, peuvent s'agglomérer en un réseau structuré. L'agrégation puis l'agglomération en masse dans la solution est permise par un rapprochement des protéines et l'apparition d'associations intermoléculaires qui supplantent les répulsions électrostatiques qui dominantes avant chauffage.

Un chauffage trop rapide conduirait à une agrégation désordonnée suite à un déploiement incomplet de la globuline. De la nature et de l'intensité des forces attractives/répulsives entre protéines globulaires dénaturées vont dépendre leurs propriétés de gélification (Clark et al., 2001). En présence de groupements sulfhydryls libres et exposés, des réactions d'échanges de ponts disulfures S⁻/SS sont à prévoir mais ne sont pas essentiels à la formation d'agrégats stables (Hoffman & Van Mil, 1997).

En préliminaire à des études de gélification, les propriétés thermiques des globulines de pois ont été comparées avec celles de soja. Par un chauffage à 10°C/min, Shand et al. (2007) et Sun et al. (2010) ont montré par AED une élévation de 85-86 à 93-94°C de T_d pour un isolat de globulines de pois de laboratoire (10% m/v) en augmentant la concentration en NaCl de 0 à 0,3-0,35M et à pH 7 et 5,6, respectivement. Sun et al. (2011) ont obtenu des valeurs de T_d passant de 90,5 à 93,3°C en augmentant la vitesse de chauffage de 0,5 à 2°C/min, et cela sans variation de ΔH_d . Il a été suggéré un déploiement plus lent de la structure des globulines de pois. Par ailleurs, De larges pics endothermiques sur les thermogrammes étaient révélateurs de la juxtaposition des pics endothermiques pour l'ensemble des oligomères de la famille des vicilines (Shand et al., 2007). A pH 7,6, les conglycinines 7S et glycinines 11S de soja, présentent quant à elles des pics endothermiques distincts pour des valeurs de T_d de ≈ 75 et 93°C, respectivement (Renkema et al., 2000). Le type d'extraction des globulines se répercutait sur la conservation de leur structure native. En l'absence de sels, la valeur de $\Delta H_d \approx 7,3$ J/g_{protéines} reflétaient un plus grand niveau de dénaturation par précipitation isoélectrique (Shand et al., 2007), comparé aux ≈ 16 J/g_{protéines} à une méthode d'extraction saline (Sun et al., 2010). En revanche, des isolats industriels utilisés dans ces deux études ne présentaient pas de pic endothermique, traduisant bien que les protéines avaient été dénaturées au cours de l'extraction.

Une température, ainsi qu'une enthalpie de dénaturation plus élevées ont été observées par AED à pH 7 pour différentes globulines 11S que 7S extraites de graines. A pH 7 et pour

1. Etudes bibliographiques

des forces ioniques I de 0,08 à 0,2, Kimura et al. (2008) et O’Kane et al. (2004_{b,c}) ont obtenu des valeurs de T_d entre 72 et 76°C pour des vicilines et de 81 à 88°C pour des légumine de pois, chauffées à 1°C/min.

Les différences de T_d sont attribuées aux différences de structures quaternaires trimériques pour la famille des 7S et hexamériques pour les 11S. Au cours de leur dénaturation thermique, le pic endothermique des légumine est obtenu à des valeurs de T_d plus élevées, traduisant bien le niveau d’énergie supérieur par rapport aux vicilines pour rompre leur structure native (Marcone et al., 1998_c). En outre, il a été montré que l’ajout de thiols-bloquants (20 mM N-éthylmaléimide (NEM)) ne modifiait pas significativement les propriétés thermiques des légumine 11S de pois (O’Kane et al., 2004_c).

- **La formation d’agrégats protéiques**

La nature, la composition en polypeptides, la concentration protéique initiale, le couple temps/température, le couple temps/température, ainsi que les facteurs extrinsèques du solvant vont affecter les interactions inter-protéines. Il en résultera des modes d’agrégation et donc des morphologies d’agrégats variées, qui vont affecter grandement le niveau d’interconnexions au sein du réseau protéique. Il en va des propriétés mécaniques du gel protéique, comme cela a été montré pour des protéines de lactosérum (Bryant et al., 1998 ; Clark et al., 2001 ; Langton & Hermansson, 1992). Une fois les agrégats formés, ils s’associent s’ils sont suffisamment stables et nombreux en un réseau tridimensionnel. La transition sol-gel est complexe, et un mécanisme général a été proposé par Clark et al., 2001. Une agrégation et une agglomération trop rapide des agrégats tend à former des réseaux de plus en plus hétérogènes jusqu’à ce qu’il n’y ait plus de structure à proprement parlé sans rigidité apparente (gel précipité) (Foegeding, Bowland, & Hardin, 1995). Concernant les morphologies d’agrégats protéiques, on distingue les agrégats fibrillaires ou amassés, schématisés aux **Figures 1.5-6**.

1. Etudes bibliographiques

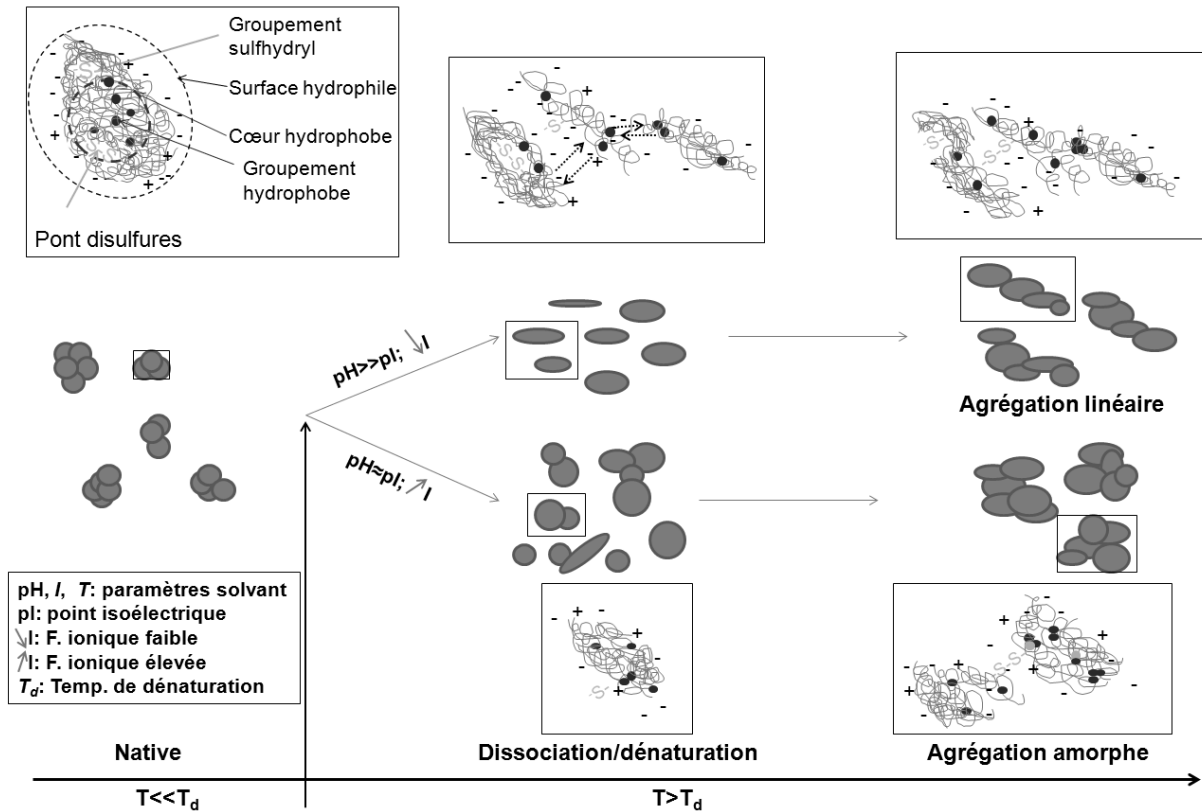


Figure 1.5 : Mécanisme général de dénaturation/agrégation thermique de globulines en fonction des paramètres du solvant appliqués (adapté d'après Bryant et al., 1998 ; Clark et al., 2001).

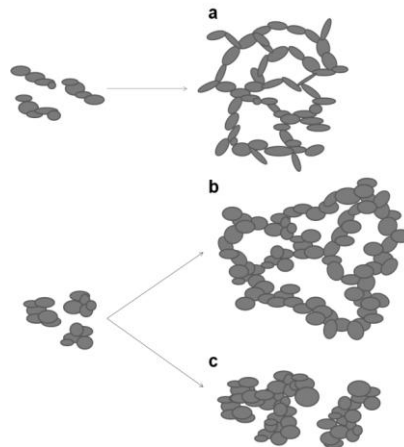


Figure 1.6 : Morphologies d'agrégats protéiques assemblés, lorsque la concentration en protéine excède la concentration seuil de gélification (selon les paramètres du solvant). (a) : structures fibrillaires et association en réseau fin filamenteux ; (b) : agglomérats associés en un réseau plus grossier, hétérogène ; (c) coagula (d'après Bryant et al., 1998).

Agrégats fibrillaires (ou filamenteux) (i) : Ce type d'agrégation se produit lorsque les répulsions électrostatiques entre protéines partiellement dépliées sont fortes (pH éloigné de pI, force ionique faible). Un chauffage lent jusqu'à une température proche de T_d est requis. Dans

1. Etudes bibliographiques

un premier temps, la dénaturation consiste en une rupture progressive de la structure compacte des globulines, par dissociation des sous-unités (Clark et al., 2001). Puis dans un deuxième temps, les globulines dépliées vont s'associer de manière linéaire du fait de la balance des répulsions électrostatiques et interactions hydrophobes possibles. La température est le facteur limitant, car la dénaturation doit être suffisamment progressive afin d'éviter une agrégation trop rapide par surexposition des zones hydrophobes. La solution protéique est alors chauffée à une température très proche de T_d . Des globulines de soja ou de la glycinine 11S purifiée ont révélé pouvoir s'agréger en l'absence de sels et à pH 7,6 en fibrilles (Renkama et al., 2000 ; Lakemond, de Jongh, Pâques, van Vliet, Gruppen, & Voragen, 2003). Ces mêmes auteurs ont noté par dichroïsme circulaire que la proportion en feuillets β par rapport aux structures secondaires de la glycinine native augmentait lorsque les agrégats étaient formés à une concentration sous le seuil de gélification. Cela constituait un signe d'agrégation en fibrilles (Clark & Lee-Tuffnel, 1986).

Dans ce cas, les gels formés sont de transparents à faiblement translucides (Clark et al., 2001 ; Langton et al., 1992). Cela reflète bien un processus d'agrégation homogène, dont les filaments protéiques d'un diamètre inférieur à 50 nm forment un réseau infini.

Marcone et al. (1998_c) ont caractérisé par dichroïsme circulaire les structures secondaires et tertiaires de la glycinine de soja et de plusieurs globulines 11S extraites de graines de monocotylédones/dicotylédones. Celles-ci montrent typiquement une proportion élevée en feuillets β et faible en hélices α , de l'ordre de 10% et de 50% pour les légumineuses de pois, respectivement. Par ailleurs, O'Kane et al. (2004_b) ont analysé par la même méthodologie les modifications de structures secondaires lors d'un chauffage de solutions diluées de vicilines et de vicilines/conviciline de pois. Il a été observé à partir de 55-60°C à un chauffage de 1°C/min une diminution des proportions de structures secondaires en hélices α et feuillets β , mais celles-ci stagnaient par la suite aux alentours de 20% dans les deux cas. Il peut être proposé dans ces conditions la formation, non-exclusive, d'agrégats de vicilines/conviciline fibrillaires. Considérant leur haute stabilité thermique et leur proportion élevée en feuillets β , les conditions de dénaturation des globulines de légumineuses doivent être sélectionnées soigneusement pour promouvoir la formation d'agrégats fibrillaires.

Agrégats agglomérés (ou amorphes) (ii) : ces agrégats protéiques sont obtenus à un niveau plus bas de répulsions électrostatiques, obtenus à une température nettement plus élevée que T_d . L'agrégation est plus rapide et plus aléatoire, aboutissant à des masses

1. Etudes bibliographiques

protéiques denses et sphériques. Li et al. (2007) ont montré que des dénaturations/agrégations de globulines de soja non séparées à pH 7 en présence de concentrations croissantes en sels (0-0,4 M NaCl) menaient à des macro-agrégats de plus en plus volumineux. Cela était attribué d'une part à une diminution de la charge globale de surface des protéines, et d'autre part à la plus grande promotion des interactions physiques hydrophobes à une température d'incubation supérieure de 10°C à T_d . De même, une concentration plus élevée en protéines au départ mène à des agrégats plus massifs, plutôt amorphes.

Les gels obtenus par agrégation amorphe sont plutôt opaques, reflétant une agglomération de particules volumineuses (>1 μm). Les réseaux protéiques sont plus grossiers et de densité hétérogène, aussi des pores de solvant plus larges augmentent les phénomènes de synérèse. (Beaulieu et al., 1999 ; Turgeon et al., 2001).

1.1.1.8. Des gels thermiques de globulines végétales ; comparaisons pois-soja

Outre la maîtrise des conditions de dénaturation/agrégation des protéines en solution, le suivi de la gélification et l'évaluation des propriétés structurelles des gels obtenus mettent en œuvre une série de méthodes pour des caractérisations multi-échelles, allant de la rhéologie aux faibles (**Annexe A.3**)/grandes déformations, la Microscopie confocale à balayage laser (MCBL) (**Annexe A.4**), voire la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) ou en Transmission (MET) (**Annexe A.5**).

- **Comparaison glycinines de soja et légumine 11S de pois**

O'Kane et al. (2004_c) ont comparé des gels thermiques de légumine de pois et de glycinine de soja à des concentrations respectives de 9,9 % et 7,5% (m/v), pH 7,6 et $I=0,2$. L'effet des cinétiques de chauffage et de refroidissement a été évalué. Un lent refroidissement (0,2°C/min) permettrait notamment aux protéines de rester en conformation dépliée et d'exposer plus longuement les sites apolaires et fonctions sulfhydryls et ponts disulfures (**Figure 1.7**). L'ajout de NEM (20 mM) n'altérerait pas significativement l'élasticité (indice de rigidité) du gel pour un refroidissement à 1°C/min. Toutefois celle-ci diminuait à 0,2°C/min. Un comportement similaire a été mis en évidence pour la glycinine 11S de soja (**Figure 1.7b**). Cependant la légumine de pois donnait des gels moins élastiques, au regard de la concentration en protéines plus élevée de 2,4% par rapport à la glycinine de soja. Des échanges de ponts disulfures en plus des interactions non-covalentes renforceraient la structure du gel. Il a été évoqué plus haut que les glycinines de soja possédaient davantage

1. Etudes bibliographiques

d'acides aminés soufrés que les légumineuses de pois ; l'accessibilité de ces derniers serait un paramètre clé dans leur contribution au réseau protéique (O'Kane et al., 2004_c, 2005). Les acides aminés soufrés sont le plus souvent profondément enfouis dans le cœur hydrophobe des globulines natives 11S. Le traitement thermique influe sur la cinétique de dénaturation (« ouverture » de la structure compacte des globulines) et par conséquent sur la cinétique d'aggrégation par exposition des groupements hydrophobes. Eventuellement la mise en place d'un tel environnement (hydrophobe) favorable permettrait par la suite des échanges de ponts disulfures à proximité des zones de jonction entre protéines dépliées. Les auteurs ont obtenu dans la suite un renforcement des gels de légumine par re-chauffage et re-refroidissement lents de celui-ci, alors que le gel de glycinine recouvrait sa fermeté d'avant le deuxième traitement thermique ; l'hypothèse que davantage d'échanges de ponts disulfures se produisent pour les gels thermiques réchauffés de légumine a donc été émise. Par ailleurs, les interactions entre chaînes dépliées de glycinine stabilisant le réseau gélifié seraient optimales dès le premier traitement thermique.

Par ailleurs, un réseau de légumine plus dense et davantage interconnecté a été mis en évidence par MET lorsque le refroidissement était plus lent (**Figure 1.8**).

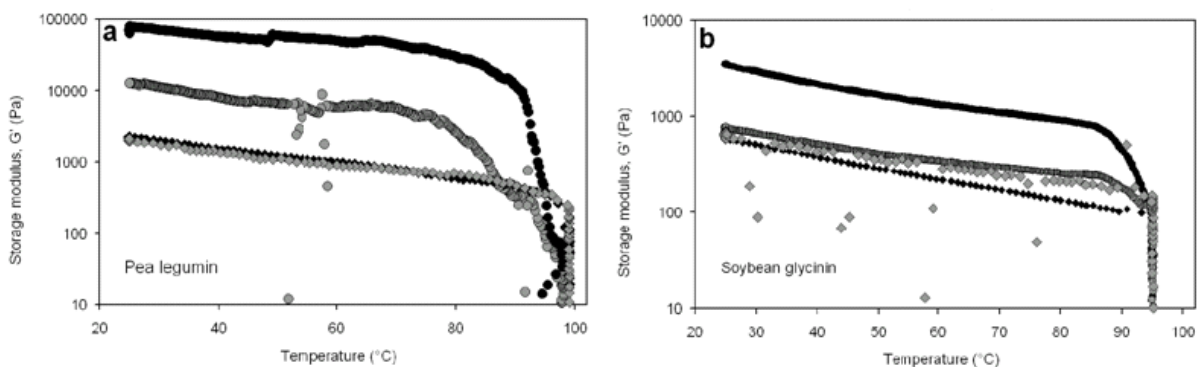


Figure 1.7 : Développement du module de stockage G' pour des gels chauffés à $1^\circ\text{C}/\text{min}$, à pH 7,6 et $I=0,2$, et avec deux vitesses de refroidissement. (a) : légumine de pois (9,9 % - m/v); (b) : glycinine de soja (7,5%). Losanges et cercles noirs : refroidissements à $1^\circ\text{C}/\text{min}$ et $0,2^\circ\text{C}/\text{min}$, respectivement ; losanges et cercles gris : refroidissement à $1^\circ\text{C}/\text{min}$ et $0,2^\circ\text{C}/\text{min}$ en présence de l'agent NEM (20 mM), respectivement (d'après O'Kane et al., 2004_c). Les mesures ont été effectuées à une fréquence de 0,1 Hz et à une déformation de 0,015% (0,01% pour les solutions de protéines de soja).

1. Etudes bibliographiques

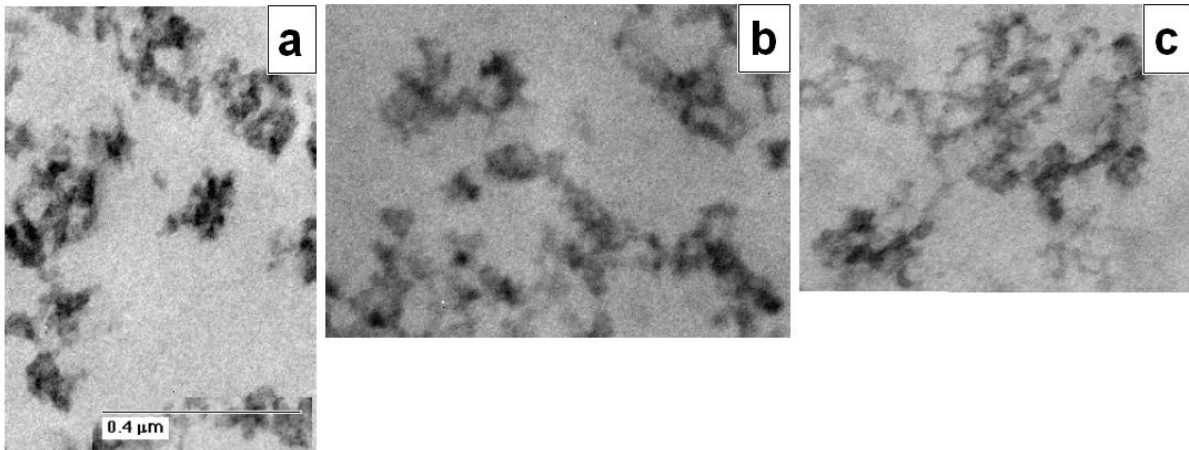


Figure 1.8 : Observation au MET de l'ultrastructure d'un réseau protéique formant un gel de légumine de pois (8,9%, m/v). La vitesse de chauffage est de 1°C/min, pour un refroidissement de : (a) : 1°C/min ; (b) 0,5°C/min ; (c) : 0,2°C/min (D'après O'Kane et al., 2004_c).

- **Comparaison conglycinines 7S de soja et vicilines/conviciline de pois**

Renkema, Knabben, & Van Vliet (2001) ont obtenus des gels thermiques de β -conglycinine 7S, en présence de 0,2 M NaCl moins rigides que des gels de glycine à une même concentration en protéines (9%, m/m), et cela en dépit que la vitesse de chauffage de 1°C/min ne permettait pas l'implication éventuelles de liaisons covalentes (échanges de ponts disulfures) pour la glycine. Du fait d'une stabilité thermique plus faible que la glycine en raison de sa conformation trimérique à l'état natif, la gélification de la β -conglycinine débutait à une température inférieure ($\approx 56^\circ\text{C}$) que la glycine ($\approx 90^\circ\text{C}$). Les gels thermiques de β -conglycinine étaient moins rigides et moins déformables que ceux de glycine pour une même concentration de départ en protéines. D'une manière générale, les gels obtenus à pH 7.6 dans les deux cas étaient plus fermes qu'à 3.8, du fait d'une moindre solubilité suggérée des protéines chauffées à pH acide. Les raisons pour lesquelles la β -conglycinine serait moins gélifiante que la glycine seraient encore mal définies ; ainsi que la force des interactions entre protéines dénaturées, la morphologie et la taille des agrégats qui s'assemblent ensuite, les différences de structure des réseaux étaient les explications possibles avancées par les auteurs.

O'Kane et al. (2004_b) ont montré que des fractions vicilines formaient des gels thermiques plus ou moins turbides selon la quantité de conviciline qu'elles contenaient ; une quantité plus importante en conviciline à pH 7,6 et à une force ionique faible tendait à augmenter fortement les répulsions électrostatiques entre protéines. Egalement un moindre déploiement de la fraction vicilines enrichie en conviciline diminuait l'exposition des groupements hydrophobes, réduisant l'agrégation thermique. La gélification était possible à

1. Etudes bibliographiques

partir 14% (m/v) de vicilines/conviciline, alors que des gels de viciline seuls étaient obtenus à 10%. En augmentant la concentration en sels de 0 à 1 M NaCl, l'écrantage de l'excès de charges portées par la N-extension de chaîne de la conviciline permettait finalement la formation d'un gel turbide, similaire à un gel de vicilines obtenu à la même concentration (10%) et à partir d'une force ionique plus faible. Une diminution du pH jusqu'à 3,8 allait dans le même sens, diminuant la concentration critique de gélification dans les deux cas à 6%. La rhéologie aux grandes déformations a par ailleurs montré que les gels transparents (vicilines/conviciline) étaient moins fermes que ceux qui étaient turbides (viciline pratiquement seule) ; ceci indiquerait que des gels plus homogènes formés par des agrégats linéaires ne donnaient pas forcément des structures plus rigides. La fermeté serait davantage liée à la densité du maillage du réseau et de la force des attractions (hydrophobes...), du nombre de contacts inter-protéines. De plus, O'Kane et al. (2005) ont rapporté qu'un enrichissement en conviciline dans un isolat de globulines de pois pouvait être la cause d'une rupture du réseau protéique. Comme facteur clé aux cinétiques d'agrégation et d'agglomération protéiques en réseau, ce phénomène évoqué ci-dessus illustre la balance entre intensité des répulsions électrostatiques et interactions hydrophobes induites par le traitement thermique (ici défavorable à l'agrégation).

- **Des gels thermiques obtenus à partir de globulines de pois non-séparées**

O'Kane et al. (2005) ont montré sur plusieurs isolats commerciaux de protéines de pois de cinq cultivars différents que la concentration minimale de gélification thermique des globulines non séparées était de l'ordre de 16% (m/v), pH 7,6 et faible force ionique. Par ailleurs, Sun et al. (2010) ont obtenu des gels protéiques pour des concentrations à partir de 5,5 jusqu'à 18% (m/v), mais à pH 5,6 et dans 0,3 M NaCl (**Figure 1.9**). Les suivis de gélification par rhéologie aux faibles déformations montrent qu'il n'y a pas de dépendance entre la transition sol-gel (point de gélification) et la concentration initiale en globulines, celle-ci étant de $\approx 83-86^\circ\text{C}$. Comme évoqué précédemment, l'ajout de sels tend à réduire les répulsions électrostatiques et de favoriser les interactions non-spécifiques principalement hydrophobes entre protéines. Les deux modules G' et G'' augmentent rapidement entre 80 et 95°C et le gain de rigidité de la structure se poursuit au cours du refroidissement (**Figure 1.9a**). Les gels finaux présentent néanmoins une augmentation de leurs modules dans les hautes fréquences, ce qui montre que des gels viscoélastiques sont obtenus, présentant des imperfections de structure (**Figure 1.9b**). D'ailleurs les valeurs finales de $\tan \delta$ ($\approx 0,16$) pour l'ensemble des gels confirment une contribution marquée du module visqueux G'' . L'isolat

1. Etudes bibliographiques

commercial présente des aptitudes médiocres à la gélification, avec une élasticité inférieure de dix fois à celle de l'isolat de laboratoire faiblement dénaturé. Enfin, une augmentation de la concentration en protéines donne des gels plus fermes du fait du nombre de contacts plus importants entre protéines dénaturées et une densification plus élevée du réseau protéique.

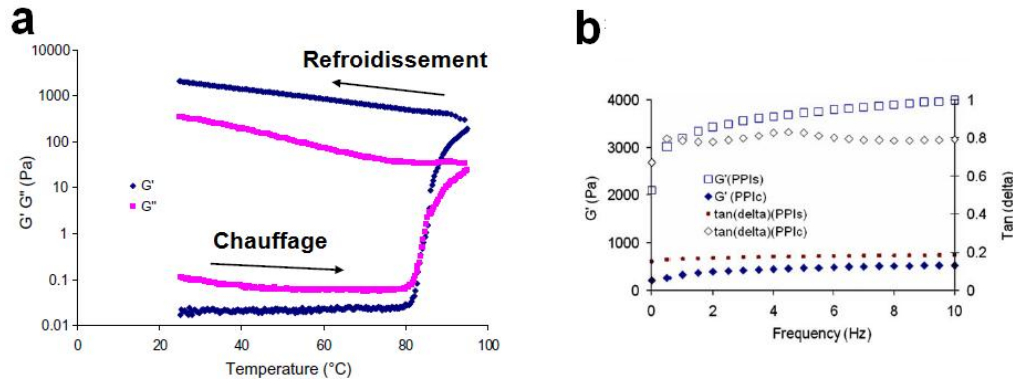


Figure 1.9 : Allures des modules G' et G'' pour des gels de protéines de pois (PPIs et PPIc, respectivement isolats de laboratoire et commercial) dans 0,3M NaCl, pH 5,65, chauffage et refroidissement à 2°C/min, incubation 30 min à 95°C. (a) : évolution de G' et G'' en fonction de la température de chauffage et (b) : Spectres mécaniques pour des gels de PPIs-c à 14,5% (m/v). Les mesures ont été effectuées à une fréquence de 1 Hz (excepté (b)) pour une déformation de 0,02% (d'après Sun et al., 2010).

Les isolats employés par O'Kane et al. (2005) contenaient des quantités variables de légumine (20-28%). Une concentration seuil de gélification a été déterminée à 16% (m/v) dans tous les cas. L'élasticité finale des gels serait liée en partie au nombre potentiel de ponts disulfures établis dans le réseau protéique lors de la gélification, et non pas forcément à la quantité de légumine présente dans l'isolat (**Figure 1.10**). Un refroidissement plus lent ne donnait pas forcément une plus grande élasticité du gel (**Figure 1.10a**) ; l'accessibilité et la position des groupements sulfhydryles par rapport aux ponts disulfures des légumine dépendraient du cultivar de pois. Un blocage des groupements sulfhydryles exposés par ajout de NEM n'avait pas non plus d'effet remarquable ; un plus grand nombre de fonctions sulfhydryles exposées ne résultait pas forcément en des gels plus élastiques (Alting, Hamer, de Kruif & Visscher, 2003). Ainsi, certaines légumine présenteraient des groupements sulfhydryls trop proches les uns des autres. Sous l'effet du traitement thermique, la formation rapide de larges agrégats associés via des ponts disulfures rigidifieraient les chaînes polypeptidiques et empêcheraient d'autres interactions supplémentaires de type hydrophobe (**Figure 1.10b**). En conséquence, de moindres possibilités d'interactions entre protéines participant au réseau seraient à prévoir. Par blocage des sulfhydryles, l'agent NEM augmente la flexibilité des chaînes dépliées, favorisant davantage d'interactions hydrophobes et aboutissant à un gain d'élasticité. A l'inverse, des groupements sulfhydryles profondément

1. Etudes bibliographiques

enfois joueraient un rôle mineur dans le processus de gélification. Il semblerait finalement que l'accessibilité des résidus hydrophobe soit déterminante pour l'agrégation et en conséquence une plus grande cohésion du réseau protéique, mettant en exergue un grand nombre d'enchevêtrements.

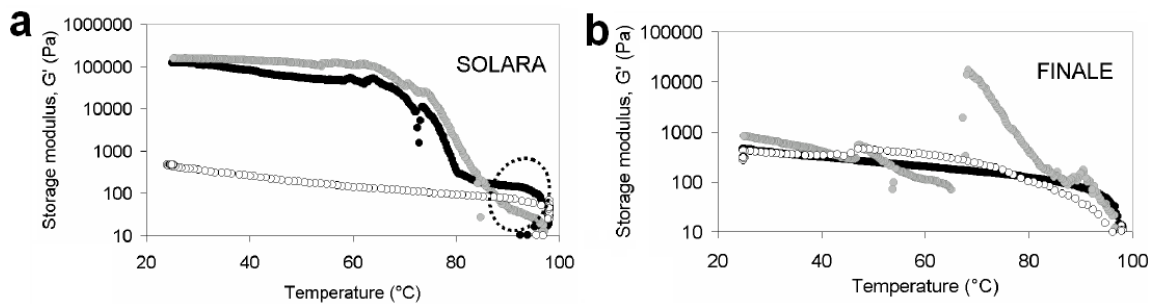


Figure 1.10 : Evolution, du module G' au cours de la gélification d'isolats commerciaux de protéines de pois (18%, m/v) à pH 7,6, faible force ionique. (a) : isolat « riche » en légumine (28% du total des polypeptides, par SDS-PAGE) ; (b) : isolat « riche » en conviciline (14%). Le chauffage s'est effectué dans tous les cas à 1°C , et l'incubation à 98°C pendant 30 min. Cercles blancs : refroidissement à $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$; Cercles noirs et gris : refroidissement à $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en absence et en présence de NEM (20 mM), respectivement. Les mesures ont été effectuées à une fréquence de 0,1 Hz pour une déformation de 0,015% (d'après O'Kane et al., 2005).

Les gels de protéines de pois présentent globalement une élasticité moindre que les gels de protéines de soja, du fait de la combinaison de facteurs structurels (position des résidus d'acides aminés, conformation de chaîne...) et de composition des isolats (Shand et al., 2007 ; Sun et al., 2010). Sun et al. (2012) ont mis en évidence que des ajouts élevés de NEM et de DTT (>50 mM) réduisaient la force des gels de globulines de pois, signifiant le rôle modéré des échanges de ponts disulfures entre sulfhydryles et polypeptides constitutifs des sous-unités de légumine dissociées. De plus, l'ajout de SDS (10 mM) d'urée ou de chlorure de guanidium ($>3\text{M}$), impliqués dans la rupture des liaisons non covalentes, empêchaient la gélification. Ces éléments confirmeraient le rôle primordial des interactions électrostatiques/hydrophobes dans la formation du réseau gélifié. En outre, les isolats commerciaux de globulines de pois montrent des propriétés médiocres de gélification (Shand et al., 2007, Sun et al., 2010, 2011) ; cela est attribué d'emblée à leur faible solubilité initiale.

1.1.1.9. Une alternative : des gels protéiques dits « à froid »

L'ajout de sels est souvent nécessaire pour permettre une gélification thermique, diminuant la concentration critique de gélification par augmentation des interactions hydrophobes potentielles. Néanmoins, il en résulte des gels la plupart du temps opaques,

1. Etudes bibliographiques

plutôt hétérogènes comme peuvent en témoigner les phénomènes de synérèse (Langton et al., 1992). Une méthodologie de gélification des protéines à température ambiante a été proposée par Bryant et al. (1998). L'enjeu était d'obtenir des gels transparents à réseau protéique filamenteux, et à une concentration inférieure à celle utilisée lors des gélifications thermiques. Dans le cas des gels « à froid », les étapes de dénaturation/agrégation et de gélification sont espacées dans le temps. Il s'agit donc dans un premier temps (i) de chauffer et d'incuber à une température proche de T_d la solution protéique, à une concentration généralement inférieure à 10% (m/v, m/m) et en assurant un maximum de répulsions électrostatiques (pH supérieur généralement à 7 car éloigné du pI, absence de sels). La solution contient alors des agrégats solubles et stables. Puis dans un deuxième temps (ii) et à température ambiante, la diminution des répulsions électrostatiques entre agrégats est effectuée, ce qui entraîne leur assemblage. Dans certaines conditions, un réseau structuré peut se former comme dans le cas des gels thermiques. Les stratégies les plus usitées de réduction des répulsions entre agrégats sont de deux types : par ajout de sels ou par acidification progressive (Ju & Kilara, 1998).

- **Ajout de sels : effets de la cinétique, de la nature et de la concentration**

La présence de contre-ions conduit à des interactions dipôle-dipôle avec les groupements carboxylate à la surface des agrégats. Selon leur concentration, des cations monovalents (Na^+ , K^+ ...) assurent un écrantage partiel ou total des charges négatives. L'ajout de cations divalents (calcium), outre le fait qu'ils génèrent une plus haute force ionique à des concentrations plus faibles que des monovalents, permet la formation de ponts salins entre agrégats à l'origine du réseau protéique tridimensionnel. La concentration, le mode d'addition du calcium en solution vont affecter les caractéristiques du gel obtenu « à froid ». Les procédés employés peuvent être (i) une dialyse de la solution de protéines pré-agrégées ($\approx 5-10\%$, m/v) contre une solution de CaCl_2 (de 0 à 120 mM) ou (ii) un ajout direct en petite quantité d'une solution concentrée de CaCl_2 , homogénéisation et repos. Les premières expérimentations d'une telle gélification à froid ont été opérées par Barbut & Foegeding (1993) et Hongsprabhas & Barbut (1999) sur des solutions de β -lactoglobuline pré-agrégées, dialysées contre une solution de CaCl_2 .

Pires Vilela, Cavallieri, & Da Cunha (2011) ont comparé les deux méthodologies sur des solutions de globulines de soja, par ajout direct ou diffusion lente par dialyse contre des solutions de CaCl_2 (20 mM) ou KCl (60 mM), à une même force ionique I de 60 mM. Des gels protéiques ne pouvaient être obtenus par ajout direct de KCl/CaCl_2 ou diffusion lente de KCl , pour des raisons d'agrégation trop rapide (avec CaCl_2), ou d'une trop faible réduction

1. Etudes bibliographiques

des répulsions électrostatiques (avec KCl). La liaison quasi-instantanée du calcium et l'agitation généraient plutôt une suspension de coagulas et non un gel homogène. Il a été suggéré qu'une fourniture graduelle en calcium évitait la sur-agrégation protéique due à un effet de salting-out. Une augmentation de la concentration initiale en agrégats 6-8% (m/m) résultait en des gels plus fermes, plus cohésifs et à meilleure capacité de rétention d'eau (voir ci après **Figure 1.23a**, **partie 1.2.2.5**).

Pourtant, l'ajout direct de CaCl_2 semblait fonctionner dans la gélification de globulines de soja pré-agrégées thermiquement (9%, m/v) à pH 7, comme il l'a été proposé par Maltais, Remondetto, Gonzalez & Subirade (2005). Des gels à froid ont été obtenus effectivement, mais présentant des opacités supérieures et des moindres capacités de rétention d'eau à partir de 10 jusqu'à 20 mM de calcium. Le calcium pouvait former effectivement des ponts salins entre les agrégats protéiques, mais aussi pourrait réduire localement les répulsions électrostatiques au voisinage des groupements hydrophobes. Ainsi, les interactions hydrophobes seraient favorisées entre protéines (Marangoni, Barbut, McGauley, Marcone, & Narine, 2000). Le nombre de groupements chargés exposés à la surface des agrégats dépendaient des conditions de pré-dénaturation et de la concentration en protéines de départ. Par la suite, il a été observé par MET qu'une concentration en calcium de 10 mM donnait des structures de gels (6-9 % de protéines pré-agrégées thermiquement, m/v) au maillage homogène et fin. Cependant celles-ci apparaissaient plus grossières à 20 mM et contenaient des pores plus larges de solvant (**Figure 1.11**) ; sur les **Figures 11a** et **11b** sont donc mis en évidence respectivement une structure filamenteuse et particulière. Malgré la plus grande hétérogénéité de structure à 20 mM, ces gels présentaient une plus grande élasticité. Il est à noter que la transition sol-gel avait lieu avant le début des mesures en rhéologie dynamique, ce qui est probablement une cause de rupture du réseau protéique émergent. Afin de justifier leur démarche, les auteurs ont précisé que cette probable perturbation se reproduisait de manière identique dans tous les cas de gels étudiés.

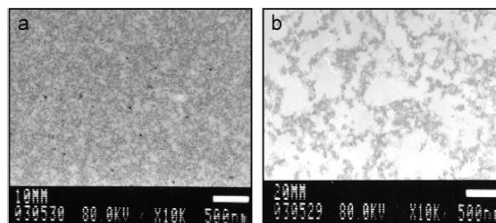


Figure 1.11 : Ultrastructure de gels de globulines de soja pré-agrégées (8%, m/v) par ajout direct de calcium à (a) : 10 mM ; (b) : 20 mM (d'après Maltais et al., 2005).

1. Etudes bibliographiques

Dans une étude suivante, Maltais, Remondetto, & Subirade (2008) ont prouvé par des méthodes complémentaires que les agrégats obtenus par traitement thermique (première étape) étaient les éléments constitutifs des gels formés par ajout de calcium (lors de la deuxième étape). Le mode d'association des agrégats dépendait clairement de la quantité de calcium ionique apporté ; des structures fibrillaires à amorphes ont été mises en évidence pour des apports respectifs en calcium de 10 et 20 mM. Avec une concentration de 10 mM de calcium, les agrégats s'associeraient par écrantage progressif des charges négatives à pH neutre. Il en résulterait une agrégation plutôt linéaire, imposant que les protéines pré-agrégées thermiquement soient orientées dans le même sens. En revanche une concentration de 20 mM de calcium provoquerait une diminution rapide des répulsions électrostatiques, conduisant à une association plutôt aléatoire et donc amorphe des protéines pré-agrégées. Egalement la barrière d'énergie serait suffisamment abaissée pour que des ponts salins via le calcium soient établis entre les pré-agrégats, d'où le gain de rigidité pour les gels formés à 20 mM de calcium, davantage rétractés qu'à 10 mM en raison de phénomènes de microsynchronisation plus prononcés.

- **Acidification**

La modification des interactions électrostatiques entre agrégats peut s'opérer également par une acidification graduelle de la solution de protéines pré-agrégées. Cette stratégie a été développée récemment sur des solutions de protéines de lactosérum pré-agrégées. L'avantage de la méthode serait une plus grande flexibilité dans la cinétique de réduction des répulsions électrostatiques (Ju et al., 1998). L'objectif est d'amener la solution à un pH à l'équilibre proche de pI, de l'ordre de 4-5. L'agent d'acidification le plus employé est un additif alimentaire (E575) : la glucono- δ -lactone (GDL). La lente hydrolyse de la GDL en acide gluconique libère des protons en solution. La vitesse d'acidification et le pH à l'équilibre dépendent de la concentration en sels, en protéines et de la température de solution (20-40°C). Une acidification opérée par du citrate de sodium serait néanmoins trop rapide et donnerait lieu à des gels irréguliers type coagula (Alting et al., 2003). La modulation du rapport de concentrations protéines/GDL permet de jouer sur la vitesse de gélification du système.

Campbell, Gu, Dewar, & Euston (2009) ont étudié des gélifications par acidification en présence de GDL de solutions dessalées d'agrégats de globulines de soja à 8% (m/v), chauffées ou non à 95°C pendant 10 min, à un pH initial de 6,9. La quantité de GDL était variable afin d'atteindre des pH à l'équilibre entre 3,5 et 5,5. Le traitement thermique a mené à

1. Etudes bibliographiques

la formation d'agrégats présentant à la fois une plus grande hydrophobicité de surface et une exposition plus marquée des groupements sulfhydryles par rapport aux mêmes globulines mais natives (**Figure 1.12**). Il a été mis en évidence un maximum d'élasticité des gels, nettement plus élevé pour les protéines pré-agrégées, à des pH à l'équilibre de l'ordre de $\approx 4,3-4,7$. Dans ce domaine, une neutralisation des charges de surface a été mise en évidence. En même temps, une réduction du nombre de groupements sulfhydryles libres dans cette même gamme de pH a été attribuée par les auteurs à des échanges de ponts disulfures en plus des interactions hydrophobes, favorisés à un niveau bas de répulsions entre agrégats. Cela conduisait à un renforcement de la structure du réseau gélifié. Une élasticité plus élevée est d'ailleurs liée à davantage de ponts disulfures formés lorsque les gels sont réchauffés à pH acide à 95°C pendant 10 min. Une controverse repose sur la formation de ponts disulfures à pH acide, alors que les sulfhydryles seraient prépondérants à pH alcalin (>7) (Bryant et al., 1998). Alting et al. (2003) sont parvenus à former des ponts disulfures par le même procédé évoqué ci-dessus, sur de la β -lactoglobuline pré-agrégée. Les associations entre zones hydrophobes génèreraient un environnement favorable pour que des échanges de ponts disulfures s'opèrent à proximité.

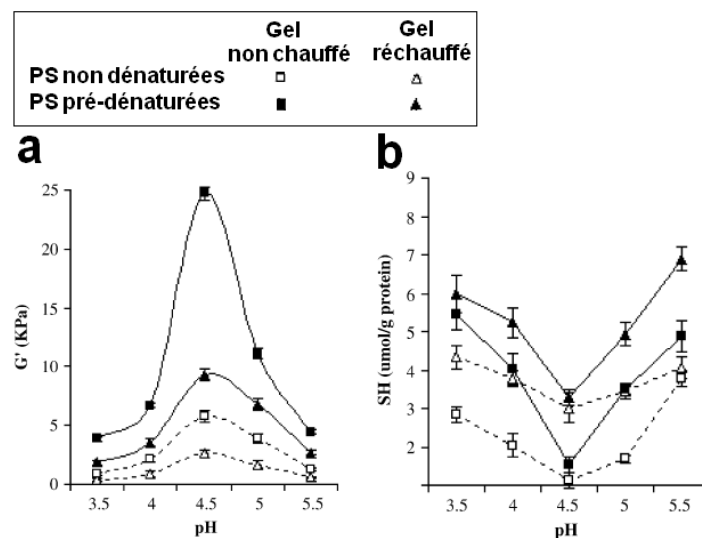


Figure 1.12 : Impact du pH final sur (a) : la fermeté des gels (module G' , fréquence 1 Hz et déformation 0,01%) et (b) : l'exposition des groupements thiols libres. Les gels sont préparés à partir de protéines de soja (PS) à 8% (m/v) pré-dénaturées ou non, acidifiés en présence de GDL à température ambiante (d'après Campbell et al., 2009).

1.1.1.10. Bilan partiel

Cette partie nous a permis d'évoquer les mécanismes de gélification des protéines globulaires végétales les plus utilisés, en insistant sur la nature des interactions inter-protéines

1. Etudes bibliographiques

qui régissent les propriétés de structure des gels formés. Les données préexistantes sur les globulines végétales concernaient principalement celles du soja et, dans une moindre mesure, celles du pois. Ces dernières donneraient visiblement des gels généralement plus faibles que les premières. Afin d'améliorer, voir flexibiliser les propriétés de texture de gels protéiques, l'ajout d'un polyoside peut être proposée (Turgeon et al., 2001 ; Tolstoguzov, 1995). De manière analogue, les modifications des propriétés de gélifications des protéines laitières en présence de ions variés ont été étudiées extensivement (Syrbe et al., 1998). Des gels multi-composés contiennent au moins un bio polymère gélifiant, le plus souvent la gélification des protéines est effectuée sous l'effet d'un chauffage adéquat. Quand le polyoside ajouté peut également gélifier, des gels mixtes sont obtenus. En particulier l'alginate de sodium gélifie à froid en présence de calcium, et cette faculté constitue son attrait principal (Nussinovitch, 1996).

1.1.2. L'alginate de sodium

1.1.2.1. Les gommes industrielles : définition et sources

Les gommes sont des macromolécules de haute masse moléculaire et à longue chaîne, la grande majorité sont solubles dans l'eau. Ces matières premières sont d'origine végétale ou microbienne, en abondance, peu coûteuses, non-toxiques, non-caloriques et biodégradables. Les gommes sont avant tout des agents épaississants. Certaines ont des propriétés gélifiantes. La compréhension de leur structure moléculaire et la maîtrise de leur extraction/production à des coûts raisonnables a généralisé leur utilisation dans les industries aussi bien alimentaires que pharmaceutiques.

Les gommes naturelles sont des matières premières non-standard. Elles sont très majoritairement sous forme d'un mélange de chaînes de tailles variables. D'un point de vue conformationnel, les chaînes de polyosides sont linéaires (amylose, agar, κ -(ou ι)-carraghénanes au dessus de la température de transition chaîne aléatoire/hélice, alginate...) ou ramifiées (amylopectine, pectines, gomme guar...), plus ou moins flexibles. Les polyosides linéaires ont un pouvoir épaississant plus marqué que des polyosides ramifiés pour une même longueur de chaîne/masse moléculaire (Whistler, 1993). A une concentration donnée, les chaînes linéaires présentent en effet un plus grand nombre possible de collisions et de chevauchements que des chaînes ramifiées, augmentant rapidement la viscosité de la solution. Elles peuvent être constituées soit d'un seul type de monomère, soit de plusieurs types de

1. Etudes bibliographiques

monomères. Les polyosides peuvent être neutres ou chargés. Le deuxième cas concerne les polyélectrolytes, dont les monomères possèdent un groupement chargé type sulfate $-\text{OSO}_3^-$ (carraghénanes) ou carboxylate $-\text{COO}^-$ (alginate, pectines faiblement méthylées, ...) polyoside (Whistler, 1993 ; Nussinovitch, 1997).

Les gommages sont obtenues à partir d'exsudats végétaux, de fruits, de graines, du génie microbiologique, ou des algues. Parmi ces algues, on distingue particulièrement les divisions algues rouges *Rhodophyceae* (agar, carraghénanes); et algues brunes *Phaeophyceae* (acide alginique). Les polyosides sont situés dans les parois cellulaires, dont la couche externe est majoritairement constituée de galactanes et d'acide alginique/alginate pour les deux ordres algaux susnommés, respectivement (Davis, Volesky & Mucci, 2003). Ces polyosides renforcent l'armature cellulosique de l'algue. Ils représentent entre 18 et 40% de la masse sèche non traitée des algues dont il est extrait.

1.1.2.2. Les alginates : matières premières et fonction biologique

Dans ce qui suit, on désignera par alginate la base conjuguée de l'acide alginique. L'acide alginique a été extrait pour la première fois en 1881 à partir de l'algue brune *Laminaria digita* par le britannique E. C. C. Stanford. Le norvégien A. Krefthing est ensuite parvenu à l'isoler en 1896. Les premières applications alimentaires des alginates remontent aux années 30, en tant que stabilisant des crèmes glacées (Nussinovitch, 1997).

Les espèces d'algues brunes (*Phaeophyceae*) les plus exploités à des fins industriels appartiennent à l'ordre des *Laminariales*, avec *Laminaria digita*, *hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* (côtes du nord de l'Europe et du Canada), *Macrocystis pyrifera* (côte californienne) (Davis, et al., 2003).

Naturellement, l'alginate est sous forme de sels insolubles de calcium, potassium et sodium de l'acide alginique. Pendant la croissance des algues brunes, l'alginate confère rigidité et flexibilité, en fonction de la composition et de la séquence en monomères des chaînes. Celle-ci varie selon l'espèce d'algue, sa localisation géographique, l'âge des différentes parties qui la constituent, la saison de récolte, voir même la force des courants marins (Haug, Larsen & Smidsrød, 1967, 1974 ; Clare, 1993).

1. Etudes bibliographiques

1.1.2.3. Extraction de l'alginate

L'alginate est extrait par précipitation/solubilisation, selon un procédé d'échange d'ions (Nussinovitch, 1997). Après lavage à l'eau des algues, celles-ci sont séchées et broyées finement. Le broyat est mis ensuite en suspension à pH acide, ainsi sont solubilisés des sucres autres que l'alginate et des acides aminés résiduels. Puis l'acide alginique est converti en sa base alginate de sodium à pH alcalin par ajout de NaHCO_3 . Une fois solubilisé, l'alginate est précipité par ajout de chlorure de calcium, rincé à l'eau abondamment afin d'éliminer les matières solubles. Le gel d'alginate de calcium est retraité à l'acide. Finalement, l'alginate de sodium est réobtenu par ajout de NaHCO_3 , la solution est séchée, le solide broyé. Ce procédé permet d'obtenir de l'alginate de sodium relativement pur et inodore (Clare, 1993 ; Nussinovitch, 1997).

1.1.2.4. Structure

Les alginates ont une masse moléculaire fluctuant entre ≈ 50 et ≈ 420 kDa, en moyenne d'environ 150 kDa (Stokke, Draget, Smidsrød, Yuguchi, Urakawa & Kajiwara, 2000). Les chaînes d'un même échantillon suivent avec une distribution large monomodale de masses moléculaires.

L'acide alginique est un copolymère linéaire formé par l'enchaînement de deux type de monomères : l'acide « G » α -L-guluronique (ou α -L-gulopyranosyluronique) et son épimère en C₅, l'acide « M » β -D-mannuronate (ou β -L-mannopyranosyluronique), liés entre eux par une liaison glycosidique 1 \rightarrow 4 (Nussinovitch, 1997). Une représentation de leur base conjuguée est donnée à la **Figure 1.13**. La position du groupement carboxylate impose une liaison équatoriale/équatoriale entre monomères M, d'une liaison axiale/axiale entre les monomères G et axiale équatoriale entre M et G (et inversement entre G et M). Les constantes de dissociation (pKa) de G et M sont respectivement de 3,65 et 3,38 (Liu, Qian, Shu, Tong, 2003). Considérant des dimères consécutifs, les chaînes d'alginate sont constituées de séquences en blocs homopolymériques MM et GG, et hétéropolymériques (ou polyalternés) MG/GM (**Figure 1.14**)

1. Etudes bibliographiques

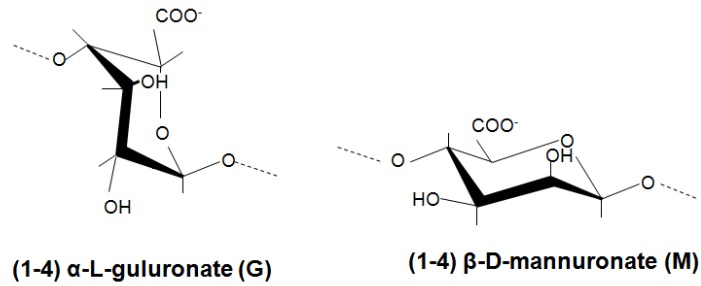


Figure 1.13 : structure des monomères α -L-gulonate (G) et β -D-mannuronate (M).

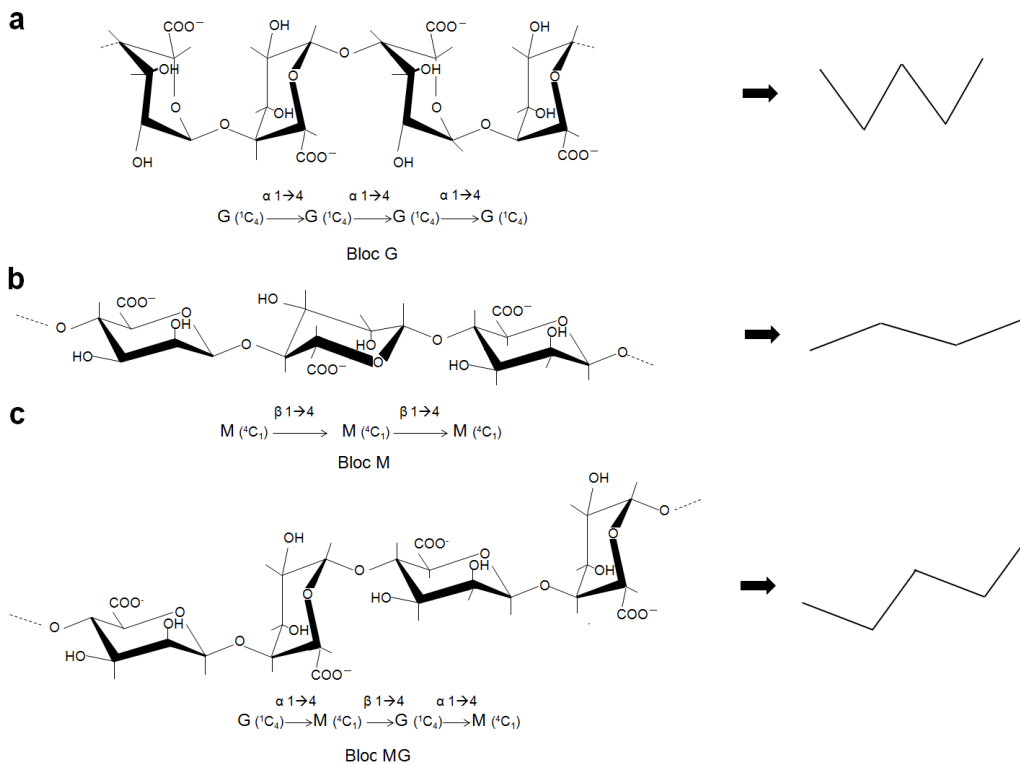


Figure 1.14 : Séquence en monomères M et G rencontrées dans les chaînes d'alginate de sodium. Les dimères sont sous forme de blocs : (a) : M ; (b) : G et (c) : MG. (D'après Nussinovitch, 1996).

En conséquence de (i) la conformation individuelle des monomères, (ii) le type de liaison entre eux et (iii) les différentes séquences en dimères/trimères, les chaînes d'alginate adoptent localement plusieurs conformations de chaîne les plus énergétiquement favorables pour les blocs homopolymérique G ou M et hétéropolymériques MG : conformation en « zigzags » étroits, en « ruban aplati » et en « zigzags » lâches (**Figure 1.14**) Les séquences riches en G seraient plus rigides et étendues en termes de configuration de chaîne que les séquences en M, comme il l'a été montré par des modélisations moléculaires de l'alginate (Braccini, Grasso & Perez, 1999).

1. Etudes bibliographiques

Des acides alginiques peuvent être produits par biosynthèse *in vitro* et post-polymérisation par des enzymes nommées épimérasés. Cependant, les algues brunes restent la matière première privilégiée industriellement et pour des questions de coûts moindres (Clare, 1993). Néanmoins, des études récentes montrent une plus grande maîtrise par le génie génomique des propriétés structurales des alginates microbiens (Valla, Li, Ertesvag, Barbeyon & Lindahl, 2001) : *Azobacter vinelandii* produit par fermentation un exopolyside constitué exclusivement de blocs homopolymériques M ; ils constituent un substrat pour la C₅-mannuronane épimérase, qui convertit les monomères M en G par épimérisation en C₅ (Clare, 1993 ; Donati, Holtan, Mørch, Borgogna, Dentiti & Skjak-Braek, 2005 ; Vold, Kristiansen & Christensen, 2006). La conversion s'opère en présence de calcium, sur deux (ou plus) monomères M adjacents et ne s'opère que sur des chaînes de plus de dix unités, et il en résulte de longues séquences hétéropolymériques MG. Le calcium agirait sur la conformation de l'enzyme et non sur les éventuelles interactions entre chaînes d'alginate et le cation.

Le rapport M/G n'est pas une donnée suffisante pour caractériser les propriétés physicochimiques/de gélification d'un échantillon d'alginate. Les fréquences des différentes séquences dimériques GG ; MM ; MG et trimériques : GGG ; GGM/MGG ; MGM sont couramment déterminées par spectroscopie ¹H RMN haut champ, sur des chaînes faiblement pré-hydrolysées (Grasdalen, Larsen and Smidsrød, 1979, 1983) (**Annexe A.7**). La longueur des blocs homopolymériques G est un paramètre clé concernant les interactions entre les ions et les chaînes d'alginate, aussi la composition et la concentration en sels influent sur la viscosité et la gélification des alginates en solution.

1.1.2.5. Les alginates en solution

En pratique, la solubilisation d'un polyside consiste en une hydratation des chaînes qui « gonflent » et qui s'individualisent par la suite. L'effet de viscosité (épaississement) est lié à la conformation des chaînes en solution. Ces paramètres de structure déterminent le volume d'occupation des chaînes de polyélectrolytes, qui s'entourent de molécules d'eau. (Iain, 1993). Comme pour tout autre polyside de haute masse moléculaire, la viscosité de la solution diminue à des températures plus élevées, à raison d'une perte de 12% de viscosité tous les 6°C de hausse de température (Clare, 1993).

- **Viscosité intrinsèque des alginates**

1. Etudes bibliographiques

Les mesures de viscosité intrinsèque $[\eta]$ renseignent sur le volume hydrodynamique moyen occupé par une macromolécule, en fonction de l'environnement ionique et de la température. Celle-ci est déterminée en régime (infiniment) dilué, où les macromolécules ont une conformation de chaîne aléatoire dont la forme varie avec les mouvements browniens (Dentini, Rinaldi, Risica, Barbeta & Skjak-Braek, 2005). Une chaîne est d'autant plus flexible que sa viscosité intrinsèque diminue en augmentant la force ionique de la solution (Smidsrød & Haug, 1971). Cet effet est notoire pour des polysides chargés, dont l'ajout de sels va peu à peu diminuer les répulsions électrostatiques, et tend donc à rapprocher les chaînes entre elles. La flexibilité des chaînes d'alginate peut être estimée par le calcul du paramètre empirique B, indépendamment de leur masse moléculaire, d'après l'**Equation (1.3)** :

$$S = B * [\eta]_{I=0,1}^v \quad (\text{Eq. 1.3})$$

Avec $[\eta]_{I=0,1}$, la viscosité intrinsèque du polyélectrolyte dans 0,1 M NaCl, l'exposant v fixé à 1,3 pour la plupart des polyélectrolytes et enfin S , mesure de la tolérance au sel. Cette dernière correspond à la valeur de la pente de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ en fonction de l'inverse de la racine carrée de la force ionique I (**Equation (1.4)**).

$$[\eta] = [\eta]_{I=0} + \frac{S}{\sqrt{I}} \quad (\text{Eq. 1.4})$$

avec, $[\eta]_{I=0}$, la viscosité intrinsèque extrapolée pour une force ionique nulle.

La valeur de B augmente avec la flexibilité de la chaîne. Les alginates, tout comme les pectines faiblement méthylées, sont considérés comme des macromolécules semi-flexibles, avec des valeurs de B de l'ordre de 0,03-0,04 (Smidsrød et al., 1971). Les mesures effectuées par Dentini et al. (2005) tendent à montrer que B serait de l'ordre de 0,036 pour des alginates riches en MM et/ou MG, et plutôt de 0,032 pour des alginates riches en GG.

- **Effet de la concentration**

En régime dilué, une macromolécule est à conformation de chaîne aléatoire. Un régime semi-dilué est atteint lorsque la solution est davantage encombrée par augmentation de la concentration en macromolécule ; les chaînes commencent à interagir entre elles et la somme des volumes hydrodynamiques des chaînes prises individuellement dépasserait le volume de la solution (Dentini et al., 2005). Pour une même masse moléculaire moyenne, une plus grande flexibilité de chaîne diminue les possibilités de collisions entre elles, aussi la

1. Etudes bibliographiques

concentration de début de chevauchement se déclare à des concentrations plus hautes que si la chaîne était plus rigide. Ainsi, le moindre volume hydrodynamique de chaînes flexibles génèrera un effet épaississant qui se déclare à des concentrations plus élevées que des chaînes rigides de même masse moléculaire (Clare, 1993). Dans le même temps, une plus grande rigidité occasionnera une moindre dépendance concentration/viscosité (Lai & Chiang, 2002).

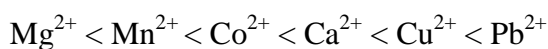
La longueur des séquences homopolymériques en G, du moins à partir d'une certaine limite, influencerait peu le caractère plus étendu des chaînes d'alginate, comme suggéré par Smidsrød et al., (1971) (Dentini et al., 2005 ; Vold et al., 2006). Cependant, la composition et de la concentration en sels de la solution vont modifier les interactions entre chaînes et cela dépendra de la séquence de l'alginate considéré.

- **Effets de la nature et de la concentration en sels**

L'acide alginique est insoluble dans l'eau. Les sels d'alginate en présence de cations divalents (ou polyvalents) sont également insolubles, à l'exception notable du magnésium (Haug & Smidrød, 1965_a). Les sels d'alginate monovalents sont solubles. De fortes concentrations en NaCl (>1 M), par écrantage total des charges, peuvent faire précipiter les chaînes d'alginate. Une augmentation de la force ionique entraîne une contraction des chaînes d'alginate, entraînant une diminution de la viscosité de la solution. Un optimum de viscosité serait atteint à une force ionique de 0,1 M. Il est à noter que l'alginate est plus sensible à la présence de cations divalents que des cations monovalents ; cela est d'autant plus marqué pour des alginates riches en monomères G (Haug, 1961).

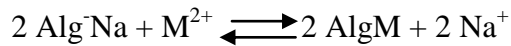
L'alginate étant un échangeur de cations, une compétition entre des cations monovalent et divalent est à prévoir ; l'affinité de l'alginate pour le calcium est plus forte quand le rapport $[Ca^{2+}]/[Na^+]$ augmente (Neiser et al., 1999). Ces auteurs ont reporté une augmentation de la viscosité d'une solution d'alginate de sodium à 0,1% (m/m), M/G = 1,6, pour des ajouts faibles en calcium et à faible force ionique (<0,1 M). Au-delà de 4 mM de calcium, la viscosité chutait du fait de la formation de la précipitation d'alginate de calcium, forme gélifiée, diminuant la concentration réelle d'alginate en solution.

Plus généralement, l'alginate complexe d'autres cations divalents. Il a été montré que l'affinité de l'alginate augmentait dans l'ordre croissant de la série suivante (Haug & Smidsrød, 1965_b ; Davis et al., 2003):



1. Etudes bibliographiques

D'après les travaux de Haug et al. (1965_{a,b}), cette affinité est d'autant plus grande pour des échantillons d'alginate ayant des ratios M/G décroissants (donc riche en séquences homopolymériques en G). Une équation-bilan a été posée, régissant l'échange d'ions sodium entre l'alginate (Alg) et des cations (métaux) divalents M^{2+} :



Il n'était pas encore précisé à cette époque quel monomère pouvait lier spécifiquement les cations divalents. Il était en revanche établi que des alginates riches en monomères G (ou chaînes de polyguluronate) présentaient une plus grande affinité pour les cations divalents. Le sens de l'équilibre dépend de la sélectivité de l'alginate pour le métal considéré et donc de sa séquence.

- **Effet du pH**

Pour des pH supérieurs à 10, l'alginate précipite (Clare, 1993). Pour des pH compris entre 3,5 et 10, les fortes répulsions électrostatiques entre groupements carboxylate tendent à écarter les chaînes les unes des autres, produisant des solutions visqueuses et stables. A un pH légèrement inférieur à 3,5, la neutralisation des charges conduit à un rapprochement des chaînes qui s'insolubilisent et précipitent. En dessous de pH 3, un risque d'hydrolyse des chaînes est très probable ; l'effet est plus prononcé à hautes températures (Clare, 1993).

1.1.2.6. La gélification ionotropique de l'alginate : La « boîte à œufs »

- **Mise en évidence**

Il a été mis en évidence que des chaînes de polyguluronate de 18-26 monomères homopolymériques en G liaient spécifiquement le calcium, suivant un profil sigmoïdal de capacité de complexation. Cela suggérait une liaison coopérative entre deux chaînes alignées (Iain, 1993). Il n'y a pas liaison du calcium par des guluronates libres. Du fait de la conformation locale des séquences homopolymériques en G, les cavités en forme de diamant entre monomères peuvent constituer une loge hautement hydrophile pour les cations divalents (Clare, 1993).

Par analogie, le modèle de la boîte à œufs a été suggéré : par la présence de fonctions carboxylate, la conformation des chaînes en relation avec l'ajout de cations peut être étudiée par dichroïsme circulaire : l'agrégation des chaînes de polyuronides induite par le calcium (et

1. Etudes bibliographiques

autres cations divalents) s'accompagne de changements drastiques de conformation des chaînes homopolymériques en G, alors que les chaînes en M ne semblaient pas affectées significativement (Grant et al., 1973 ; Morris, Rees, Thom & Boyd, 1978).

- **Proposition d'un mécanisme de gélification**

La stœchiométrie de la réaction de complexation a été considérée. Il a été montré que l'intensité du spectre obtenu en dichroïsme circulaire augmentait de manière linéaire jusqu'à une concentration en calcium de moitié de la concentration équivalente en polyguluronate (chaînes de plus de 30 monomères). Au-delà, le spectre restait constant. Il a été montré dans la suite que la quantité de calcium complexée et inamovible par ajout de fortes concentrations en sodium était stœchiométriquement égale à la moitié du nombre de sites possibles de liaison de la chaîne de polyguluronate seule. Ceci indiquerait que l'association entre deux chaînes d'alginate s'opérerait par complexation du calcium au niveau des zones de jonctions hélicoïdales de conformation 2/1, menant à la formation de dimères de polyguluronate G. A partir d'une mole de calcium pour deux moles de polyguluronate, il y aurait théoriquement saturation des sites de liaison, avec une conversion totale en polyguluronate de calcium et 100% de calcium lié (Iain et al., 1993). Pour des alginates (et non plus des polyguluronates), l'effet coopératif pour la liaison du calcium entre deux chaînes - à l'origine la gélification de l'alginate - est principalement attribué aux zones homopolymériques en G, même si celles-ci peuvent être ponctuées çà et là de monomères M. A une concentration critique en calcium, la formation de dimères stables est le pré-requis pour que puisse se produire par la suite des associations dimère-dimère. La gélification consiste en l'agrégation des dimères (jusqu'à 4 chaînes par zone de jonction) qui s'organisent en un réseau tridimensionnel, englobant le volume de la solution. L'ajout de chaînes courtes de polyguluronate - capables de bloquer une seule zone de jonction enrichie en G et sans capacité de complexation inter-chaînes - à une solution de chaînes d'alginate intactes empêcherait la formation d'un gel stable. A l'opposé, l'ajout de polymannuronate était sans effet (Jørgensen, Sletmoen, Draget & Stokke, 2007).

Fang et al. (2007) et Funami et al. (2009) ont décrit sous l'angle du rapport $R_{[Ca^{2+}]/[G]}$ - la concentration en calcium libre en relation avec la concentration en monomères G - trois étapes simultanées dans la liaison du calcium par de l'alginate, en régime dilué (0,026 ; 0,052 %, m/v) (**Figure 1.15**). Il y aurait à partir d'un rapport $R_{[Ca^{2+}]/[G]} \approx 0,25$, l'émergence de structures ordonnées - voire microcristallines (Grant et al., 1973) - attribuées à des chaînes complexées en dimères suivant le modèle de la boîte à œufs. Pour des ajouts supplémentaires

1. Etudes bibliographiques

en calcium deux possibilités sont envisageables selon la flexibilité de la molécule d'alginate.

(i) Lorsque l'alginate présente une plus grande rigidité de chaîne par la présence de blocs homopolymériques G plus étendus, la poursuite de l'augmentation de la taille moléculaire serait liée à l'association inter-chaînes d'alginate sous forme de dimères. En augmentant la fourniture en calcium, un nombre moindre de chaînes contribueraient à la formation de dimères, d'où une diminution de R (Fang et al., 2007). Pour des raisons d'encombrement stérique, il apparaît que la diffusion des ions calcium et leur liaison au niveau des blocs homopolymériques en G soient davantage entravées au fur et à mesure que la complexation des chaînes s'effectue (Funami et al., 2009). Lorsque le calcium est libéré *in situ* à partir de carbonate de calcium (CC), la viscosité élevée des solutions d'alginate concentrées peut empêcher la dispersion homogène du sel et conduire à des hétérogénéités dans le gel (Fang et al., 2007).

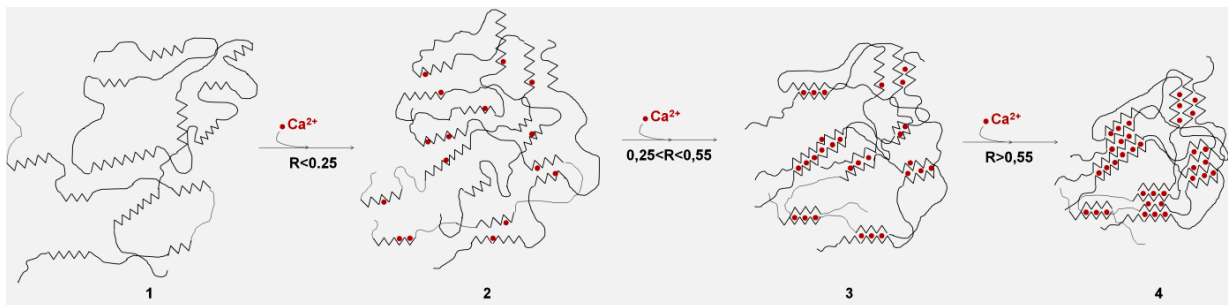


Figure 1.15 : Mécanisme de gélification de l'alginate en fonction du rapport $R_{[Ca^{2+}]/[G]}$. Le niveau de complexation des chaînes au niveau des séquences riches en G dépend de la fourniture croissante en calcium. (1) : solution d'alginate sans calcium ; (2) : formation de monocomplexes et rapprochement des chaînes ; (3) : formation de dimères suivant le modèle de la boîte à œufs ; (4) formation de multimères (adapté d'après Fang et al., 2007).

Au cours de la première étape (i), quand le calcium est en défaut pour un rapport $R_{[Ca^{2+}]/[G]} < 0,25$, des monocomplexes sont formés suite à la chélation de quelques cations par les chaînes libres. La réduction des répulsions électrostatiques tend à rapprocher les chaînes d'alginate entre elles, et l'émergence de points chargés positivement va permettre des attractions locales entre chaînes. Cette étape consiste en quelque sorte à une nucléation : point de départ à la dimérisation. Des attractions locales inter-chaînes conduisent à des micro-gélifications qui augmentent la viscosité de la solution, ce qui lui donnerait un comportement de solution concentrée. Pour un apport supplémentaire en calcium, la deuxième étape (ii) se produit pour un rapport $0,25 < R_{[Ca^{2+}]/[G]} < 0,55$. Suivant le modèle de la « boîte à œufs », les dimères sont formés par association de deux monocomplexes. Enfin, pour $R_{[Ca^{2+}]/[G]} > 0,55$, la troisième étape (iii) consiste en la formation de multimères, par des associations latérales

1. Etudes bibliographiques

entre dimères, qui peuvent dépasser quatre chaînes au niveau des zones de jonction homopolymériques en G (Jørgensen et al., 2007). Pendant cette dernière étape, la structure du gel se renforce du fait du nombre croissant d'associations multimériques, d'entrelacement des chaînes interconnectées et de ce fait du maillage plus dense du réseau d'alginate. Pour des ajouts supplémentaires en calcium, une forte contraction du réseau par rapprochement excessif des chaînes conduit généralement à une synérèse du gel.

- **Conformations locales de chaîne pour une liaison stéréospécifique du calcium**

La plus grande affinité du calcium pour les blocs homopolymériques G s'expliquerait par une plus grande stéréospécificité que pour les blocs en M. Il n'est pas exclu que les blocs M ou MG puissent lier le calcium, mais ce dernier ira se complexer préférentiellement au niveau des blocs G (Clare, 1993). Par des modélisations moléculaires, la conformation des zones de jonction G impliquées dans la complexation inter-chaîne via le calcium a été investiguée (Braccini, Grasso & Perez, 1999). Il a été montré que les liaisons hydrogène, qui contribuent d'une part à la rétention d'eau dans le gel, seraient impliquées d'autre part dans le renforcement des interactions inter-chaînes (Braccini et al., 2001). De manière à ce que l'association de chaînes de polyguluronate via le calcium soit la plus énergétiquement favorable, il a été proposé lors de la formation de dimères que les chaînes en vis-à-vis soient en position antiparallèle. Il a donc été défini dans cette étude un modèle de « boîte à œufs décalée ». Par complémentarité de forme, des liaisons de Van der Waals sont favorisées par le plus grand nombre de contacts inter-chaînes. Cette configuration des dimères d'alginate permet en outre l'établissement de liaisons hydrogène supplémentaires au détriment des liaisons électrostatiques via calcium. De plus, ces mêmes auteurs suggéraient que les interactions inter-chaînes lors de la formation de dimères étaient davantage spécifiques que les interactions dimère-dimère, de plus faible intensité. Ces associations dimère-dimère suivraient d'ailleurs une autre voie de complexation, au vu des différentes conformations possibles adoptées par les multimères. Cela serait attribué au grand nombre de position des groupements carboxylates portés par les dimères, permettant de nombreux arrangements – $\text{COO}^- \text{--Ca}^{2+} \text{--OOC}^-$ énergétiquement favorables.

- **L'implication fort probable des blocs hétéropolymériques**

Il a été reconnu depuis plusieurs années aux séquences hétéropolymériques MG des capacités de lier des cations divalents (Morris et al., 1978 ; Wang et al., 1993). La gélification

1. Etudes bibliographiques

d'alginate riches en séquences MG a longtemps été attribuée à la faible proportion des blocs homopolymériques G ; des gels faibles sont ainsi obtenus. La complexation inter-chaînes se ferait principalement suivant le modèle de la boîte à œufs au niveau de ces zones de jonction, mêmes courtes, Les zones MG ne contribueraient qu'au caractère flexible du gel (Smidsrød, Glover, & Whittington, 1973).

Cette explication ne semblait pas suffisante lorsque des alginate bactériens traités par épimérisation, pouvaient gélifier, et même s'ils présentaient presque exclusivement des séquences MG. Donati et al. (2005) posent le problème et suspectent l'implication de zones de jonctions homopolymériques/ hétéropolymériques GG/MG via le calcium. Par ajout de calcium, des modifications conformationnelles dans les chaînes strictement polyalternées MG ont été mises en évidence par dichroïsme circulaire. En mettant en présence un alginate strictement hétéropolymérique (strictement MG) et un alginate riche en G, la formation de zones de jonction mixtes MG/GG via le calcium était effectivement la seule explication à la gélification du mélange. Il a été montré dans la suite que de longues séquences alternées étaient impliquées dans des zones de jonction secondaires MG/MG, préjudiciable cette fois à la fermeté finale du gel. Ceci a été mis en évidence pour deux échantillons d'alginate présentant des compositions en dimères MM, GG et MG voisines, mais différentes si l'on considère trois monomères consécutifs. Un gel formé par des alginate à longues séquences MGM ($F_{MGM} > 0,2$) donnerait des gels à plus faible rigidité (car entravée par les jonctions secondaires MG/MG), et un effet de synérèse plus prononcé pour une fourniture excessive de calcium. Pour des gels à base d'alginate majoritairement polyalterné ($F_{MG} = 0,32$) à 1% (m/v), un apport de calcium supérieur à 16-18 mM menait à un effondrement du gel. Il a d'ailleurs été observé par microscopie à force atomique que de tels gels présentaient une structure assez lâche par rapport à un alginate riche en G, où le maillage du réseau était visiblement formé de chaînes rigides (Funami et al., 2009).

- **Le modèle de la boîte à œufs, une vision (trop) simpliste ?**

Lorsque la fourniture de calcium est faible, il apparaît que la dimérisation des chaînes d'un alginate plutôt homopolymérique en M ou polyalterné en MG soit amorcée à un rapport $R_{[Ca^{2+}]/[G]}$ de 0,25, alors que la dimérisation de chaînes d'alginate riches en G débuterait pour un rapport $R_{[Ca^{2+}]/[G]}$ inférieur à 0,25 (Funami et al., 2009). Il apparaît que le mode de gélification dans ce cas limitant diffère du modèle de la boîte à œufs, ainsi ces auteurs ont décrit que la dimérisation faisait intervenir en premier lieu des zones de jonction inter-chaînes MG/GG via le calcium. La gélification serait d'autant plus précoce que les chaînes d'alginate

1. Etudes bibliographiques

ont des séquences polyalternées étendues. Un gel est donc obtenu à des concentrations basses en calcium et son élasticité peut diminuer pour un apport supplémentaire en calcium. Dans ce cas, les zones de jonction inter-chaînes GG/GG - de plus forte affinité de liaison pour le calcium - seraient davantage impliquées et déstabiliseraient le gel. Les raisons invoquées seraient des blocs GG plus épars et plus aléatoirement répartis sur les chaînes, qui fixeraient préférentiellement le calcium cette fois. Cela aboutirait à des gels plus faibles faisant préférentiellement le calcium en faisant ainsi intervenir un nombre moindre de zones de jonction ou plus courtes. Dans le cas opposé, la gélification d'alginate riches en G nécessiterait davantage de calcium, et le gel se renforcerait en augmentant la fourniture de ce dernier. Selon la séquence en M et G de l'alginate, la concentration de calcium liée à l'alginate ne serait pas le seul facteur de rigidité, un optimum de cette concentration à apporter serait propre à chaque alginate particulièrement polyalterné (la tendance serait une diminution pour des séquences MG plus étendues) (Donati et al., 2005).

1.1.2.7. Des procédés de gélification pour des gels d'alginate homogènes

- **Paramètres dont dépend la gélification**

Les paramètres intrinsèques (i) à l'échantillon d'alginate concernent le ratio M/G, les séquences homopolymériques/hétéropolymériques, la longueur des blocs qui conditionnent la flexibilité/rigidité des chaînes, la masse molaire, la concentration en polyoside...

Les paramètres extrinsèques (ii) concernent essentiellement la nature et la concentration en sels, avec une considération toute particulière pour sodium et calcium. D'un point de vue cinétique de gélification, il semble qu'une augmentation progressive de la concentration en calcium en solution soit la meilleure solution : (i) un ajout rapide de calcium provoque la formation de particules gélifiées et donne ainsi lieu à des inhomogénéités macroscopiques (Jørgensen et al., 2007). Une libération plus lente de calcium permet la formation de gels homogènes. Une plus grande densité du réseau d'alginate est permise dès lors que l'on s'approche du nombre maximum de jonctions possibles entre zones riches en G dans le même alignement. En revanche, la formation rapide et donc aléatoire de dimères en prélude à la gélification ne permet pas d'atteindre un haut niveau de complexation des chaînes. Dans le même temps, la cinétique de liaison de calcium diminue au fur et à mesure de la gélification ; l'« épaissement » du réseau est un facteur limitant de la diffusion des chaînes et de calcium (Funami et al., 2009).

1. Etudes bibliographiques

- **Deux méthodologies retenues pour une gélification homogène**

Une dialyse (i) de la solution d'alginate contre une solution de chlorure de calcium : le calcium diffusant à travers la membrane de dialyse, il en résulte la formation d'un cylindre gélifié plus rigide à la périphérie qu'au centre (Jørgensen et al., 2007). Cette méthode ne semble donc pas la plus adaptée.

La libération in situ de cations calcium (ii) à partir d'un sel insoluble (carbonate de calcium (CaCO_3)) à pH alcalin ou d'une forme de calcium qui se solubilise lentement (CaSO_4). Le contrôle de la cinétique de gélification s'opère le plus souvent en présence d'un agent acidifiant, qui permet une libération lente de calcium. L'acidification graduelle du milieu permet la dissociation, espacée dans le temps, du sel de calcium à l'origine très peu soluble (Neiser et al., 1999 ; Jørgensen et al., 2007). L'agent d'acidification le plus employé est la GDL.

➔ Nous venons de décrire de manière extensive les propriétés structurales et physicochimiques des globulines de pois - et des alginates en solution. Nous avons recensé les paramètres de solvant les plus souvent utilisées, et leur(s) modification(s) au cours du temps induisant la gélification de chacun des biopolymères évoqués. Néanmoins la situation est plus complexe lorsque protéine et polyoside sont en mélange. Dans la suite, **Il s'agira pour nous de s'attarder sur deux phénomènes *a priori* antagonistes : une séparation de phase (instabilité) et une gélification (stabilisation macroscopique) concomitantes. L'enjeu est d'exploiter le phénomène d'incompatibilité à l'origine du déphasage, ce qui constitue l'enjeu majeur de notre étude.**

1.2. Les systèmes mixtes protéine - polyoside - eau : caractérisation du comportement de phase et gélification

1.2.1. Des systèmes aqueux de biopolymères : états de phase

1.2.1.1. Approche qualitative

La compréhension des interactions entre des biopolymères de nature différente est d'un intérêt capital lors de la formulation d'aliments complexes, car celles-ci conditionnent la

1. Etudes bibliographiques

stabilité dans le temps du produit fini qui les contient. Protéines et polysides sont des constituants majeurs des matrices alimentaires, aussi l'étude des solutions de polyélectrolytes en tant que systèmes simplifiés permet d'étudier leur comportement de phase. En effet, les interactions protéine-polyside altèrent les fonctionnalités de chacun des biopolymères, et donnent lieu le plus souvent à des systèmes multiphasiques complexes (Doublie et al., 2000). En règle générale, l'addition d'un polyside de haute masse moléculaire à une solution de protéines mène généralement à une séparation de phase. Au-delà d'une concentration totale en protéine-polyside dite seuil, les deux biopolymères deviennent rapidement immiscibles (Grinberg et al., 1997). Selon les interactions entre les biopolymères « associatives » ou « ségréгатives », le mélange instable se résoudra à l'équilibre thermodynamique en deux phases présentant une répartition inégale des deux biopolymères. Les interactions non-covalentes entre protéine et polyside peuvent être attractives spécifiques (électrostatiques) ou non-spécifiques (également électrostatiques, liaisons hydrogène, de Van der Waals, hydrophobe...). Par contre, des effets ségréгатifs se produisent lorsque les attractions protéine-polyside (anionique) sont inhibées par des répulsions électrostatiques non-spécifiques entre les deux biopolymères.

Les mélanges aqueux protéine-polyside dits « réels » peuvent être approché par les concepts thermodynamiques qui régissent le comportement de phase de systèmes modèles de deux polymères (semi-)synthétiques (Syrbe, Fernandes, Dannenberg, Bauer & Klostermeyer, 1995). Cependant des écarts dans les prédictions établies pour des modèles théoriques proviennent de l'hétérogénéité et la diversité des biopolymères ; **les facteurs de polydispersion concernent la distribution de tailles, de masses moléculaires et de charges des biopolymères, les conformations de chaîne locales et globales, la séquence en monomères, la rigidité/flexibilité des segments constitutifs de chaque biopolymère** (Grinberg et al., 1997). La nature non-standard des biopolymères complexifie grandement la prise en compte de l'ensemble des interactions qui gouvernent le comportement de phase des mélanges réels (Doublie et al., 2000 ; Syrbe et al., 1998). Une autre complication concerne les fluctuations locales de charges de surface des polyélectrolytes ; le nombre et la nature des groupements chargés peuvent varier d'un monomère à l'autre le long de la chaîne d'un polyélectrolyte. Ainsi, une analyse qualitative est permise dans la plupart des systèmes ternaires aqueux.

1. Etudes bibliographiques

1.2.1.2. Etats de phase à l'équilibre

En résumé, trois situations d'équilibre thermodynamique sont décrits pour des mélanges de départ de deux polymères A et B non-similaires (**Figure 1.16**) (De Kruif & Tuinier, 2001 ; Doublier et al., 2000 ; Syrbe et al., 1998). On distingue :

- **La miscibilité (i)**

Les mélanges de A avec B (ou leurs monomères respectifs a et b) sont stables et monophasiques. En régime dilué, les polymères n'interagissent pas du fait de leur éloignement dans l' « espace » du mélange. Néanmoins, des interactions plutôt attractives ou répulsives apparaissent lorsque la composition globale du mélange augmente.

- **Une séparation de phase dite « associative » (ii)**

Des interactions attractives entre A et B mènent à la formation de complexes ou coacervats A-B. Deux phases se forment, dont la plus dense contient les complexes qui sédimentent, alors que la phase du haut n'est constituée que du solvant. La stabilité des complexes dépend de la nature et du nombre de points d'ancrages entre les deux biopolymères (Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon & Hardy, 1998). Ce cas de figure est courant pour des polyélectrolytes en solution portant des charges nettes de surface opposées. Pour ce qui est des mélanges protéine-polyoside, des complexes électrostatiques inter-biopolymères se forment pour un polyoside anionique qui s'adsorbe à la surface de la protéine, chargée positivement. Dans ce cas, le pH de la solution est en dessous du pI de la protéine. Les complexes restent stables en solution pour des ajouts modérés de polyoside, ces derniers pouvant aller jusqu'à former des ponts entre les protéines. La neutralisation des charges à des concentrations plus élevées en polyoside rend le complexe irrémédiablement insoluble (Syrbe et al., 1998 ; Schmitt et al., 1998). Les sels en solution modifient l'aptitude des polyélectrolytes à se complexer, aussi des forces ioniques élevées peuvent inhiber la coacervation (Grinberg et al., 1997).

➔ N. B. : il est à noter que deux études récentes ont porté sur la formation de coacervat à base de protéines de pois et d'un polyoside anionique, en l'absence de sels. Liu, Low & Nickerson (2009) ont formé des complexes de globulines de pois natives et de gomme arabique à des pH acides ; par mesures de turbidité du mélange, un pH de 3,5 semblait maximiser les attractions électrostatiques entre biopolymères dissimilaires pour un ratio protéines/polyoside de 1 :1 (concentration

1. Etudes bibliographiques

totale de 0,05% - m/m). L'ajout de NaCl entre 7,5 et 50 mM inhiberait la coacervation. Par la suite, Klemmer, Waldner, Stone, Low, & Nickerson (2012) ont effectivement noté qu'un maximum de coacervats se formait dans un domaine de pH de 3,8-4,2, entre le pI des globulines de pois et le pKa des groupements carboxylate de l'alginate. L'ajout d'alginate à une solution de protéines abaissait le pH où l'électroneutralité de la solution était mesurée. Il a été défini un rapport protéines/alginate de 8/1 et à partir duquel (pour des concentrations croissantes en protéines, jusqu'à 20/1, la concentration totale en biopolymères restant fixée à 0,1% -m/v) l'ensemble des groupements carboxylate des chaînes d'alginate étaient saturés. Cette saturation augmentait de ce fait le pH pour lequel la neutralisation des charges dans le mélange a été observée (pH \approx 4). Une valeur de 2,75 a été définie comme étant le pH où les interactions attractives entre globulines et alginate étaient optimales, pour un ratio en biopolymères de 4 :1. Une augmentation de la concentration totale en biopolymères inhiberait le phénomène de coacervation pour des raisons d'incompatibilité ou pour un apport en contre ions (amenés par le polyoside) qui réduiraient les attractions électrostatiques par écrantage des charges de surface des biopolymères.

- **La séparation de phase dite « ségrégative » (iii)**

Il s'agit ici d'un cas fréquent, où les paramètres (extrinsèques) du solvant empêchent la formation de complexes A-B. Les interactions entre A et B sont répulsives, à l'origine de l'incompatibilité entre A et B à partir d'un seuil de concentration totale relativement bas. En résumé, les interactions polymère A ou B avec le solvant (ou encore les interactions inter-A ou inter-B) sont plus favorables que les interactions entre A et B. En d'autres termes, les répulsions entre polymères A et B sont plus fortes que la moyenne des répulsions entre A et entre B (Turgeon et al., 2001). Du fait des effets ségrégatifs entre A et B, le mélange se sépare en deux phases non-miscibles, enrichies chacune en un polymère et (presque) dépourvues de l'autre.

1. Etudes bibliographiques

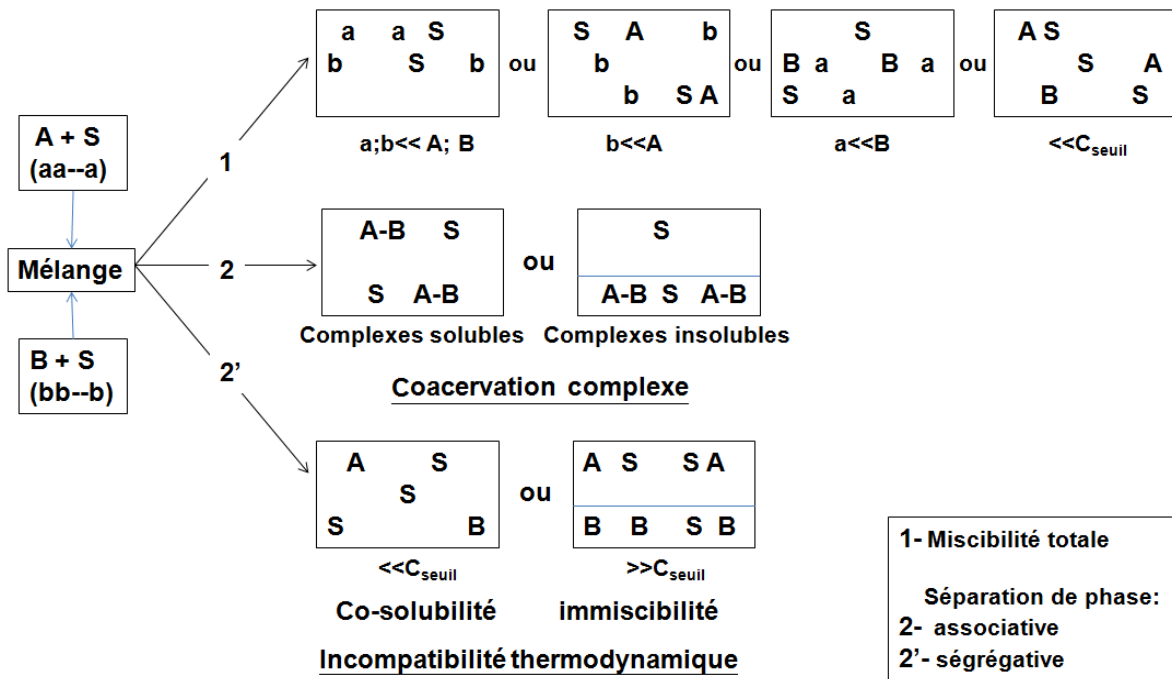


Figure 1.16 : Comportement de mélanges de polymères A et B en solution (ou monomères constitutifs a et b, respectivement) dans un solvant commun S (d'après Syrbe et al., 1998).

La séparation de phase ségrégative était naguère un moyen utile de concentrer des solutions de protéines, à des concentrations que l'on n'aurait pu atteindre en pratique avec des protéines seules (Tolstoguzov, 1995). Les limites de co-solubilité sont spécifiques à chaque système protéine-polyoside, aussi les paramètres du solvant conduisant à une séparation de phase ont été définis pour plus d'une centaine de mélanges protéine-polyoside (Grinberg et al., 1997). L'incompatibilité entraîne un partage du solvant entre les deux biopolymères initialement mis en présence, selon leur différence d'affinité pour celui-ci. Les mélanges incompatibles thermodynamiquement se résolvent en une séparation liquide-liquide entre une phase enrichie en protéine et l'autre en polyoside. La première est la plus dense et sédimente alors que la seconde, plus diluée, crème.

1.2.1.3. Niveaux d'incompatibilité

L'incompatibilité concerne des mélanges aqueux de protéines fibrillaires (gélatine) ou albumine (de sérum bovin ou ovalbumine) ou protéines globulaires (protéines du lactosérum, globulines 7S/11S) ou caséinates/micelles de caséines en présence de polyosides neutres (carboxyméthylcellulose, amylopectine, dextrane...) ou chargés (pectines faiblement méthylées, alginate, κ -carraghénanes...) (Grinberg et al., 1997, Syrbe et al., 1995, 1998 ; Tolstoguzov, 1986, 1991, 2003). En raison d'une entropie de mélange thermodynamiquement

1. Etudes bibliographiques

défavorable (voir ci-après), l'apparition d'un volume exclu pour chaque biopolymère et non accessible par l'autre définit les différences d'occupation de l'espace en solution. Cela conditionne le seuil de concentration totale en biopolymères à partir duquel se produit la séparation de phase. Ce seuil pour des mélanges gélatine/caséine avec des polyosides neutres est inférieur à 4% en protéine, alors qu'il est généralement supérieur à 4% pour des mélanges protéines globulaires-polyosides (Grinberg et al., 1997).

- **Facteurs intrinsèques (i)**

La masse moléculaire, la flexibilité/rigidité de chaîne, la polydispersion en général (néanmoins peu prise en compte), également la charge globale des biopolymères affectent leur comportement de phase en mélange (Grinberg et al., 1997). Des mélanges de protéines globulaires dans un état natif ou dénaturées/pré-agrégées avec un même polyoside montreront des comportements de phase bien différents (Syrbe et al., 1995). Compatibles à l'état natif, des mélanges avec des protéines dénaturées se sépareront habituellement à des compositions d'autant plus basses que les protéines agrégées sont volumineuses, et donc occasionnant des effets de volume exclu plus forts dans le mélange (Croguennoc, Durand & Nicolai, 2001). Une structure de chaîne plus étendue d'une macromolécule signifiera une plus grande occupation de l'espace en solution. Le caractère « linéaire » ou « ramifié » du polyoside est à prendre en compte : généralement, un polyoside linéaire présente des chaînes de plus grande taille et plus régulières qu'un polyoside ramifié de même masse molaire et de même nombre de monomères (Grinberg et al., 1997).

- **Facteurs extrinsèques affectant le comportement de phase (ii)**

Le pH, la force ionique et la nature du polyoside: la conformation spatiale de chaque polyélectrolyte en solution est également liée au pH, à l'environnement ionique et à la température. Les paramètres du solvant vont influencer sur le comportement de phase en modifiant les interactions entre protéines et polyosides en mélange. Dans le cas d'une protéine en mélange avec un polyoside anionique, un pH inférieur ou proche du pI de la protéine annulera ou diminuera le phénomène d'incompatibilité, respectivement. La force ionique peut favoriser soit une augmentation soit une réduction du niveau d'incompatibilité (Syrbe, 1995 ; 1998). A un pH éloigné de pI d'au moins deux unités où les deux biopolymères portent la même charge, un niveau médium en NaCl (0,1 M) favorisera davantage des interactions inter-protéines en réduisant leurs interactions dipôle-dipôle. En revanche, un écrantage total des charges supprimerait les effets répulsifs et pourrait diminuer l'incompatibilité. Une force

1. Etudes bibliographiques

ionique de 0.1 M est communément utilisée dans la plupart des systèmes incompatibles. Une moindre contribution des répulsions électrostatiques entre protéine et polyoside anionique (carboxylé) rendra prépondérant les effets de volume exclu au sein du mélange (Semenova & Savilova, 1998). Le niveau de séparation de phase dépendrait alors uniquement des différences de taille et de conformation de la protéine et du polyoside mis en présence. Une augmentation globale de la force ionique et du pH augmenterait le phénomène d'incompatibilité dans le mélange en inhibant la formation de complexes protéine-polyoside anionique (Grinberg et al., 1997). L'incompatibilité va de pair avec l'intensification des interactions entre protéines lorsque celles-ci sont mélangées à un polyoside anionique. Ce dernier étant particulièrement hydrophile, les paramètres de solvant renforçant les interactions hydrophobes entre protéines (d'où une moindre affinité pour le solvant) abaissera la valeur du seuil d'immiscibilité, et donc augmentera l'incompatibilité (Grinberg et al., 1997 ; Syrbe et al., 1998).

Des modifications de la température modifient le comportement de phase ; un chauffage aura tendance à élever le seuil d'immiscibilité par augmentation de l'entropie du mélange (voir ci-après). Par ailleurs, un chauffage intensif pourrait entraîner une dénaturation et une agrégation des protéines. Un système compatible à l'état natif comme de l'albumine de sérum bovin (SAB) en mélange avec des pectines faiblement méthylées à pH 6.8 témoigne d'une séparation de phase après traitement thermique, mais bloquée microscopiquement par gélification de la phase protéique (Donato et al., 2005).

1.2.1.4. Approche thermodynamique : aspects quantitatifs

- **Principe général**

A pression et à température constantes, l'évolution d'un système est conditionnée par le signe de son énergie libre de Gibbs ΔG (**Equation (1.5)**) :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Eq. 1.5})$$

H, S et T sont respectivement l'enthalpie, l'entropie et la température du système. Un mélange est stable lorsque ses composants sont miscibles, c'est-à-dire que ΔG est minimal. La séparation de phase associative ou ségrégative est conditionnée par le caractère plutôt enthalpiquement favorable ou défavorable, respectivement, des interactions entre les composés (ici des polymères) non-similaires structurellement parlant (Gilsenan et al., 2003). Les mélanges dilués de polymères sont monophasiques, présentant une contribution entropique plus importante que la contribution enthalpique générée par d'éventuelles

1. Etudes bibliographiques

interactions intermoléculaires. En augmentant la concentration totale en polymères, un désavantage entropique apparaît lorsqu'un polymère A au voisinage de l'autre polymère B perd (et vice-versa) en mobilité du fait qu'il ne puisse plus adopter librement toutes les conformations spatiales qu'ils auraient eues s'ils étaient seuls en solution. Il s'agit ici de définir un volume exclu pour chaque polymère en présence, c'est-à-dire un espace entre deux polymères du même type et non pénétrable par un polymère non-similaire (Grinberg et al., 1997 ; Tolstoguzov, 1986, 1991, 1995). Des différences nettes de volume exclu pour chaque polymère mènent à une séparation de phase ségrégative ; le désavantage entropique est compensé par le caractère enthalpiquement favorable que les polymères migrent chacun dans deux phases séparées, entourés par des polymères du même type (De Kruijff & Tuinier, 2001). D'après **Eq. (1.5)**, une diminution de la température tendra à amoindrir la contribution entropique du mélange, ainsi il sera plus favorable pour ce mélange de se déphaser plus tôt, à un seuil d'immiscibilité plus bas (ou une incompatibilité plus marquée).

- **L'introduction de la non-idéalité dans les mélanges**

Le terme entropique domine sur le terme enthalpique dans des mélanges dilués. Dans un système modèle, les forces intermoléculaires sont négligées ($\Delta H=0$). En régime semi-dilué, le comportement de phase pour des mélanges de polymères A et B à conformation de chaîne aléatoire dans un solvant commun S peut s'approcher quantitativement les coefficients d'interaction polymère-solvant χ_{A-S} et χ_{B-S} de Flory-Huggins, qui rendent compte de la qualité du solvant pour A et/ou B, (Doublier et al., 2000 ; Norton et al., 2001). Suite à la séparation de phase dans un mélange ternaire, le polymère dans la phase diluée présenterait un paramètre χ_{A-S} (ou χ_{B-S}) plus élevé que celui du polymère dans la phase la plus concentrée (Grinberg et al., 1997) ; $\Delta\chi$ est une mesure de la différence d'affinité des polymères avec le solvant et conditionnera la partition de celui-ci entre les deux phases (Grinberg et al., 1997), un faible $\Delta\chi$ se traduira par une partition plus égale du solvant entre les deux phases co-existantes.

Un troisième paramètre χ_{A-B} dit d'interaction croisée entre A et B a été introduit. Dans le cas d'une séparation de phase associative, χ_{A-B} sera négatif, traduisant des interactions entre A et B plus enthalpiquement favorables que A ou B avec S. Dans le cas contraire, une séparation de phase ségrégative sera prévisible quand χ_{A-B} sera positif, ainsi les interactions entre polymères A avec S et B avec S seront prédominantes. Ce modèle peut très bien convenir à des mélanges aqueux protéine-polyoside lorsque la protéine est fibrillaire, de conformation de chaîne allongée, type gélatine (Clark et al., 2000). Par contre, il est difficile

1. Etudes bibliographiques

de conclure pour des mélanges avec des protéines globulaires sphériques, de structure compacte (Doublie et al., 2000). De plus, le facteur polydispersion dans les mélanges réels est à l'origine de décalages entre théorie et évaluations empiriques des limites de co-solubilité.

Par une démarche similaire, Edmond & Ogston (1968) ont décrit le comportement de phase de biopolymères non chargés en milieu aqueux, en utilisant les coefficients du viriel du deuxième ordre. Grinberg et al., (1997) ont étendu de manière qualitative le concept à des mélanges incompatibles aqueux protéine (Pr) – polyside (Ps). Une séparation de phase liquide-liquide est prévisible si l'inégalité suivante est vérifiée (**Equation (1.6)**):

$$(A_{Pr-Ps})^2 > A_{Pr-Pr} \times A_{Ps-Ps} \quad (\text{Eq. 1.6})$$

avec A_{Pr-Ps} , A_{Pr-Pr} et A_{Ps-Ps} les coefficients du viriel d'interaction croisée Pr-Ps, Pr-solvant et Ps-solvant, respectivement. L'inégalité nécessite donc que A_{Pr-Ps} soit plus élevé qu' A_{Pr-Pr} et A_{Ps-Ps} . Le coefficient A_{Pr-Ps} est négatif lorsque la séparation de phase est associative, et positif pour des effets de volume exclu entre Pr et Ps (interactions répulsives), d'où des interactions Pr-Pr et Ps-Ps plus favorables. De manière analogue, la valeur de χ_{A-B} diminue d'autant plus que la complexation inter-polymères A-B est thermodynamiquement favorable (Grinberg et al., 1997). Le niveau de séparation de phase sera d'autant plus élevé que l'intensité des interactions inter-biopolymères sera forte, dans le même temps A_{Pr-Pr} et A_{Ps-Ps} vont diminuer jusqu'à atteindre des valeurs négatives.

D'après Syrbe et al. (1998), cet autre modèle est restrictif, car il simplifie les conditions limites de séparation de phase en ne considérant que les coefficients du viriel du deuxième ordre. Aussi il extrapole des comportements en milieu (semi-) dilué à des milieux plus concentrés, en négligeant des interactions qui seraient prises en compte par des coefficients du viriel d'ordre supérieur.

1.2.1.5. Les interactions non-spécifiques de déplétion

Il s'agit ici d'une description de la séparation de phase, dirigée entropiquement pour un mélange neutre de polymères idéaux non adsorbant ajouté à une suspension de particules sphériques colloïdales (**Figure 1.17**) (Tuinier, Rieger, & de Kruif, 2003). Asakura et Oosawa (1954, 1958) et Vrij (1976) ont défini le concept du mécanisme de déplétion à des suspensions de particules colloïdales en présence d'un polymère non-adsorbant, assimilé à une sphère dure pénétrable. Celle-ci est pénétrable par une autre sphère dure mais ne l'est pas par une particule colloïdale.

1. Etudes bibliographiques

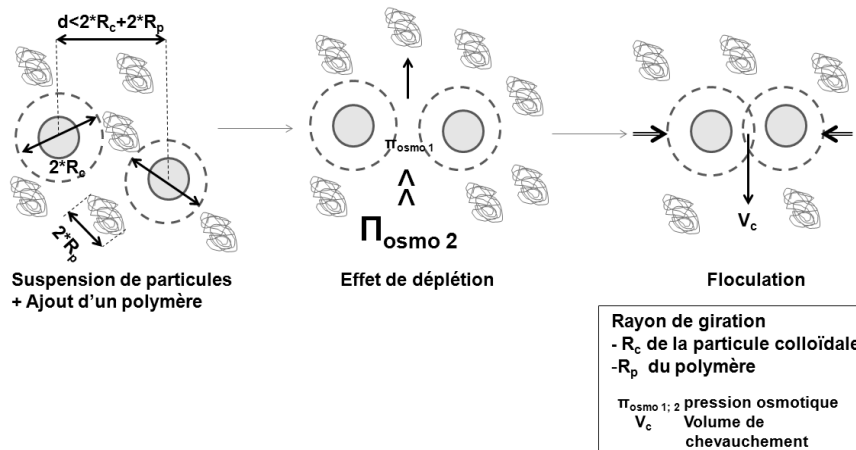


Figure 1.17 : Représentation schématique de l’interaction non-spécifique par effet de déplétion entre deux particules colloïdales en présence d’un polymère non-adsorbant (d’après De Kruif et al., 2001 ; Tuinier et al., 2003).

Un effet de déplétion a pour origine une perte d’entropie conformationnelle d’une chaîne de polymère proche de la surface de deux particules colloïdales qui se rencontrent du fait des mouvements browniens aléatoires. Il ne s’agit que d’un mécanisme non-spécifique de volume exclu. L’exclusion des chaînes de polymère initialement dans cet espace enclavé a lieu lorsque la distance d centre à centre entre les deux particules est inférieure à la somme des diamètres $2 \cdot R_c + 2 \cdot R_p$, avec R_p le rayon de giration du polymère et R_c , celui des particules colloïdales (**Figure 1.17**). Le diamètre des colloïdes est assimilé à une couche dite de déplétion. Il se forme ainsi un gradient de concentration en polymère partant du reste de la solution (dépourvue de colloïdes, concentration maximale en polymère) à la couche de déplétion (concentration nulle). Dans le même temps la pression osmotique Π générée par les chaînes de polymères est supérieure dans le reste de la solution (Π_{osmo2}) que dans l’espace inter-particules (Π_{osmo1}). L’équilibre de pression est rétabli par l’apparition d’une force d’attraction entre les deux particules colloïdales qui floculent, expulsant un volume de solution correspondant au volume de chevauchement V_c des deux couches de déplétion. Une augmentation du volume total de la solution par V_c s’accompagne d’une réduction de l’énergie libre du mélange, ainsi il est entropiquement favorable que les particules floculent, formant une phase séparée du reste de la solution contenant les polymères (De Kruif et al., 2001) (**Equation (1.7)**) :

$$\Delta G = -\Pi_{osmo} * V_c \quad (\text{Eq. 1.7})$$

A partir d’une concentration limite en polymère et colloïdes, il se produit une transition de phase macroscopique ou coexisteront à l’équilibre une phase dense, enrichie en colloïdes et une phase, plus diluée, enrichie en polymères (De Kruif et al., 2001 ; Syrbe et al.,

1. Etudes bibliographiques

1998 ; Tuinier et al., 2003). Le calcul de l'énergie libre peut servir au calcul du potentiel d'attraction entre des particules en présence d'un polymère et prévoir le comportement de phase. Des limites d'application peuvent provenir du modèle simplifié de la sphère dure pénétrable ; la polydispersité du mélange amoindrirait les effets de déplétion (Doublier et al., 2000 ; Tuinier et al., 2003). En outre, ce modèle est valide lorsque R_c est supérieur à R_p , de l'ordre de 3 à 10 fois. Il s'agit ici de définir une taille limite de colloïde. Le ratio $\xi = R_p/R_c$, permet d'évaluer l'amplitude des attractions (courtes ou longues) entre les colloïdes (Doublier et al., 2000).

Pour des systèmes protéine-polyoside, l'hypothèse des effets de déplétion conduisant à une séparation de phase a été formulée lorsque les protéines ont l'apparence de particules colloïdales, telles des micelles de caséines ($R_c \approx 100$ nm) ou des protéines de lactosérum agrégées avec des polyosides chargés ou non (Bourriot, Garnier, & Doublier, 1999_{a,b} ; De Bont, van Kempen, & Vreeker, 2002; 2001 ; Tuinier et al., 2003). L'aspect granuleux de la phase protéique mis en évidence par des études de microstructure au MCBL est quelque fois un argument suffisant pour que des auteurs postulent également des effets de déplétion du polyoside ; cela a été décrit dans le cas de mélanges protéines de soja pré-agrégées- κ -carraghénanes (Li, Hua, Qiu, Yang, & Cui, 2008). De l'aveu même des auteurs, la polydispersion dans leurs mélanges ne permettait qu'une analyse qualitative de la microstructure sous l'angle des interactions de déplétion. De Bont et al. (2002) ont comparé les morphologies de différents systèmes micelles de caséine-amylopectine ou dextrane T2000, présentant une phase protéique agrégée dans le premier système, liquide dans le second. Les rayons de giration des biopolymères mesurés expérimentalement et le calcul de ξ semblait indiquer que la transition de morphologies agrégée à liquide s'opérerait pour ξ inférieur à 0,5 et supérieur à 0,8, respectivement. A partir d'un système modèle de particules de latex colloïdales-hydroxyethylcellulose, Sperry (1984) avait noté différentes morphologies lors de la séparation de phase, passant d'une séparation liquide-solide et liquide-liquide pour $\xi < 0,3$ et $\xi > 0,5$, respectivement. Le déplacement vers des valeurs de ξ plus hautes pour un système réel proviendrait de l'hétérogénéité de charges des caséines et de la polydispersion en tailles de chaînes de polyoside.

L'incompatibilité thermodynamique reste le mécanisme général régissant un effet d'exclusion de volume à l'origine de la ségrégation entre biopolymères répulsifs (Grinberg et al., 1997). Des effets déplétion peuvent éventuellement s'ajouter, et la coexistence des deux mécanismes peut expliquer des limites de co-solubilité plus basses en pratiques que celles

1. Etudes bibliographiques

calculées théoriquement (Doublier et al., 2000). Des effets de déplétion pourraient s'ajouter à l'incompatibilité pour des protéines globulaires agrégées, de plus haute fraction volumique en solution qu'à l'état natif.

1.2.1.6. Cartographier le comportement de phase d'un système ternaire aqueux : les diagrammes de phase

Un diagramme de phase permet de définir, pour un mélange incompatible de deux biopolymères A et B non-similaires, les domaines de concentration totale en biopolymères, donnant lieu soit à des mélanges stables monophasiques, soit à des mélanges biphasiques, et cela pour un pH, une force ionique I et une température T donnés (Tolstoguzov, 1986, 1991, 1995). Une courbe de co-solubilité, la binodale, permet de délimiter ces deux domaines. La binodale est établie à l'équilibre thermodynamique, et correspond au minimum d'énergie du mélange, où les contributions enthalpique et entropique du mélange se compensent **Figure 1.18** (Gilsenan et al., 2003). Les mélanges situés sous la binodale sont monophasiques, par contre le franchissement de la binodale en augmentant la concentration totale en biopolymères produit des mélanges immiscibles. Les mélanges dans le domaine incompatible peuvent être considérés comme des émulsions « eau dans eau ».

La construction de ces diagrammes de phase est empirique (Syrbe et al., 1995 ; Grinberg et al., 1997). Elle consiste en pratique à l'élaboration d'un grand nombre de mélanges M de biopolymères Pr-Ps en criblant le plus possible de combinaisons de concentrations. Certains mélanges M_{Pr-Ps} (dilués) sont stables, d'autres plus concentrés forment deux phases, aussi le déphasage macroscopique est lié à des différences de densité entre les phases protéique B_M (celle du « bas », $[Pr]>[Ps]$) et polysaccharidique H_M (celle du « haut », $[Ps]>[Pr]$). Il s'agit de porter graphiquement mélange de départ et compositions des deux phases co-existantes à l'équilibre. Les diagrammes de phases peuvent être triangulaires pour de tels systèmes ternaires aqueux. Cependant, l'eau étant le plus souvent le constituant majoritaire à près de plus de 90% d'un mélange, le diagramme de phase exprimé en coordonnées cartésiennes est plus aisé à manier (**Figure 1.18**).

1. Etudes bibliographiques

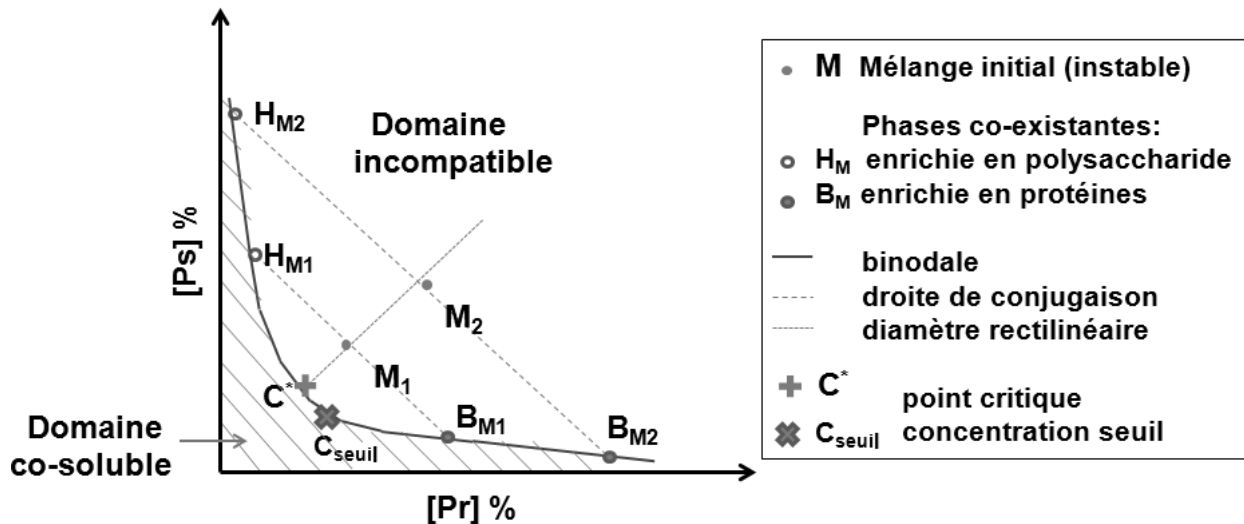


Figure 1.18 : diagramme de phase schématisé en coordonnées cartésiennes d'un système aqueux protéine (Pr)-polyoside (Ps) pour des paramètres de solvant (température T , pH , force ionique I) induisant des effets ségrégatifs (d'après Tolstoguzov, 1995).

Joindre les points de concentration en biopolymères dans les phases coexistantes pour plusieurs mélanges incompatibles permet d'établir la binodale. Tout point situé sur la binodale correspond effectivement à un mélange stable où un équilibre de concentrations entre les deux biopolymères s'est établi. L'un prédomine en présence de petites quantités de l'autre (Gilsenan et al., 2003). Cela explique que la binodale ne coïncide pas avec les axes de concentration du mélange, mais tendent de manière asymptotique vers une concentration proche de zéro du biopolymère minoritaire, d'une phase à l'autre. A partir d'un mélange incompatible, deux phases coexistantes seront effectivement stables.

Une droite de conjugaison joint les points de mélange de départ M_{Pr-Ps} avec ses phases coexistantes H_M et B_M . Tout mélange situé sur une même droite de conjugaison se séparera en deux phases qui auront respectivement la même composition, seul le rapport de volumes entre les deux phases changera, si bien que le mélange au milieu d'une droite de conjugaison se séparera en deux phases de volume égal. Une loi empirique montre d'ailleurs que le rapport des distances géométriques $B_M M_{Pr-Ps} / M_{Pr-Ps} H_M$ est égal au rapport des volumes des phases B_M / H_M . (Tolstoguzov, 1995). Lorsque les droites de conjugaison sont particulièrement pentues, l'asymétrie du diagramme de phase est augmentée. Cela témoigne que les chaînes de polyoside présentent une plus forte affinité pour le solvant par rapport à la protéine, traduisant une valeur de $\Delta\chi$ élevée (Syrbe et al., 1995).

La droite qui passe par les milieux des droites de conjugaison est le diamètre rectilinéaire. Celui-ci coupe la binodale en le point critique C^* , correspondant au mélange de concentration en biopolymères minimale se séparant en deux phases théoriquement de même

1. Etudes bibliographiques

composition et volume. Le point seuil C_{seuil} est la composition minimale à partir de laquelle la séparation de phase se produit. Graphiquement ce point est déterminé comme étant l'intersection entre la binodale et la tangente à celle-ci de pente -1. La plupart des aliments ont des compositions en Pr-Ps qui excèdent ce seuil, et leur stabilité macroscopique est due le plus souvent à un blocage par gélification (Norton et al., 2001 ; Tolstoguzov, 1995).

En résumé, une augmentation de la taille/masse moléculaire des biopolymères, de la force ionique (modérément) ou une diminution de la température, l'utilisation de polyosides linéaires et/ou carboxylés plutôt que des polyosides (de même masse) ramifiés et/ou sulfatés se traduira par un déplacement de la binodale vers les axes de concentrations, réduisant ainsi le domaine de co-solubilité.

1.2.1.7. Etude de cas : des systèmes aqueux incompatibles globulines-polyosides anioniques

- **Effet de la nature du polyoside sur le comportement de phase en mélange avec des protéines globulaires**

Dans leur large criblage de systèmes protéine-polyoside incompatibles, Grinberg et al. (1997) ont établi que le domaine d'incompatibilité du diagramme de phase se réduisait (et celui de cosolubilité augmentait et vice-versa) lorsque des protéines, toutes classes confondues, étaient mélangées dans cet ordre à des polyosides possédant des groupements carboxylate, des polyosides neutres et enfin possédant des groupements sulfate. Ceci a été mis en évidence particulièrement pour des systèmes protéines globulaires de soja-polyosides, à pH 9 ($\gg pI$), dont les concentrations seuil en biopolymères menant à une séparation de phase augmentaient dans l'ordre gomme arabique, dextrane et dextrane sulfaté. Pour une même masse moléculaire, l'incompatibilité était moins marquée pour un polyoside carboxylé ramifié (gomme arabique) que pour un linéaire (carboxyméthylcellulose). Plus proche de nos conditions expérimentales, il a été reporté pour des mélanges à pH 9 et sans sels ajoutés de protéines globulaires de soja- alginate de sodium ou pectinate des valeurs de concentration seuil en protéine- polyoside de 6,7-0,4 et 7,7-0,2%, respectivement. Toutefois, il n'est pas précisé la quantité de sels apportée par le polyoside.

Semenova et al. (1998) ont étudié les interactions entre globuline 11S (légumine) de fève avec différents polyosides, type dextrane ou pectinate, à pH 7,8 et $I = 0,1$ M. Des diagrammes de phase ont été établis pour ces deux systèmes, dont les mélanges à une

1. Etudes bibliographiques

composition initiale en biopolymères supérieure à 6 % (m/v) témoignaient d'une séparation de phase. Un effet de volume exclu moins important a été supposé lorsque le polyside était plutôt flexible (dextrane) que semi-flexible (pectinate). Une plus faible incompatibilité dans le premier cas est ainsi mise en évidence, pour une intensité d'interactions répulsives moindres. Une augmentation de la taille/masse molaire du dextrane entraîne une diminution de la concentration seuil de séparation du mélange, traduisant bien l'effet dominant de volume exclu dans des conditions proches de l'électro-neutralité.

- **Effet d'une pré-dénaturation/agrégation protéique sur le comportement de phase en présence de polysides**

Deux études en particulier ont retenu notre attention, car elles se proposaient d'étudier le comportement de phase de mélanges protéines pré-agrégées-polyoside à température ambiante. Croguennoc et al. (2001) et Li et al. (2008) ont élaboré en pré-dénaturant thermiquement, respectivement, des agrégats de β -lactoglobuline ($R_g \approx 15$ nm) et de globulines de soja de taille variable ($R_g \approx 10$ à plusieurs centaines de nanomètres). Dans les deux cas, des κ -carraghénanes ont été ajoutées en conditions non-gélifiantes (conformation de chaîne aléatoire) à la solution d'agrégats et les mélanges à température ambiante ont été réalisés à pH 7, 0,1 M NaCl. L'effet de la taille des agrégats sur le volume exclu et donc du niveau de séparation de phase ont été décrit en termes de diagramme de phase, microscopie et rhéologie. Il est à noter que des mélanges β -lactoglobuline native - κ -carraghénanes à pH 7 sont compatibles. En augmentant la taille des agrégats protéiques en solution, leur plus grande fraction volumique était à l'origine d'une séparation de phase qui se déclenchait plus précocement à des concentrations plus faibles en polyside. Des effets de déplétion - lorsque les particules protéiques sont particulièrement volumineuses - peuvent s'ajouter au phénomène général d'incompatibilité décrit pour des biopolymères non-similaires. Les agrégats protéiques s'associaient en plus grands microdomaines qui sédimentaient par la suite. Néanmoins, des effets de viscosité dus à l'enrichissement des biopolymères chacun dans deux phases séparées semblaient ralentir voir perturber la séparation de phase. En outre, le système mettait en évidence deux effets antagonistes de séparation de phase et d'agrégation. Des microdomaines plus concentrés en protéines (denses) se formaient à des concentrations plus élevées en polyside, ce qui induisait leur gélification plus rapide.

Dans l'étude menée par Li et al. (2008), les diagrammes de phase pour des systèmes protéines natives/agrégées (1 ; 5%, m/m) - κ -carraghénanes traduisaient une séparation de

1. Etudes bibliographiques

phase à des concentrations seuils en biopolymères décroissantes dans l'ordre suivant : protéines de soja natives <agrégats à 1% <agrégats à 5%.

Cet ordre s'explique aisément par un volume exclu en mélange plus importante lorsque les agrégats présentaient une masse et une taille plus élevées (**Figure 1.19**). La proximité des binodales obtenues avec les agrégats à 1% et 5% indique clairement que ce sont les agrégats de plus grande masse moléculaire/taille qui conditionnent le niveau de séparation de phase, se produisant à une fraction volumique inférieure à celle des protéines natives. Les clichés au MCBL montrent, pour une même composition en protéine - polyside initiale (4-0,35%) le passage d'agrégats isolés à des microdomaines protéiques plus denses et davantage interconnectés.

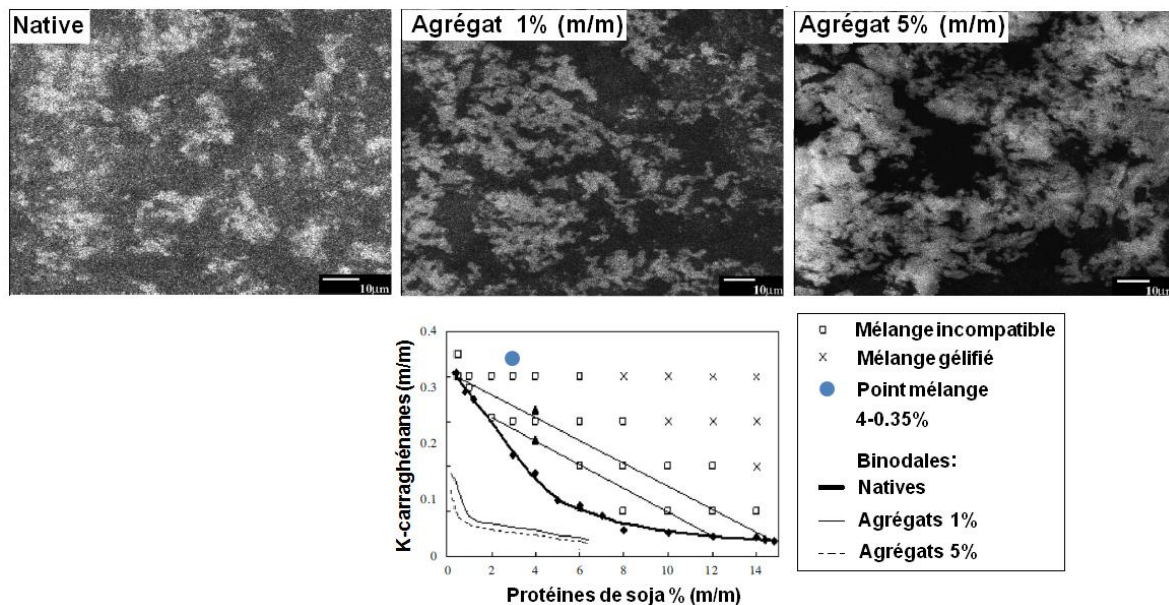


Figure 1.19 : Diagrammes de phase à 25°C de systèmes protéines de soja (i) natives/(ii) agrégées à 1% et (ii) à 5% en mélange avec des κ -carraghénanes dans 0,1 M NaCl, pH 7. Sur les clichés au MCBL obtenus pour une même composition initiale (4-0,35%), les protéines apparaissent en clair (D'après Li et al., 2008). Barre d'échelle = 10 μ m.

Dans ces deux études ci-dessus, le fait marquant était la possibilité d'une gélification à froid de la phase protéique, attribuée au rapprochement des agrégats induits par de forts effets ségrégatifs. Ceux-ci se concentraient et les microdomaines pouvaient montrer le passage d'un état liquide à un état solide, ce qui empêchait leur coalescence au cours de la maturation de la séparation de phase. Des tests de dilution tendaient à montrer que les interactions inter-agrégats au sein des microdomaines protéiques se renforçaient avec le temps, impliquant probablement des interactions physiques non spécifiques type hydrophobe et/ou hydrogène. Une agrégation protéique irréversible a été constatée dans la phase du bas par effets de

1. Etudes bibliographiques

surconcentration, induits à l'origine par de forts effets ségrégatifs induits par le polyoside. La rhéologie aux faibles déformations témoignait d'ailleurs d'une prise en gel dans le temps, cela dit très faible, pour de tels mélanges (Li et al., 2008).

1.2.1.8. Aspects cinétiques/mécanistiques de la séparation de phase

Les mécanismes de séparation de phase en relation avec l'évolution des morphologies microstructurales sont d'un grand intérêt pour l'élaboration de systèmes alimentaires simplifiés, que représentent les mélanges protéine-polyoside. La cinétique de déphasage d'un mélange sera liée à la vitesse et au niveau de maturation de chacune des phases coexistantes à une échelle microscopique, dès lors que le mélange sera mis au repos après agitation. En pratique, il s'agira de déterminer à quel moment figer la séparation de phase à l'état microscopique, entre autres par gélification ou par effet de température (Butler & Heppenstall-Butler, 2003 ; Norton et al., 2001). La maturation de chacune des phases serait alors bloquée dans un état instable. Généralisant les mêmes méthodologies que pour des mélanges de polymères (semi-)synthétiques immiscibles, ces mêmes auteurs se sont penchés sur l'évolution de microstructure pour des systèmes gélatine-dextrane/maltodextrine, dont la séparation de phase pouvait être figée par un refroidissement des mélanges sous 30°C. De Bont et al. (2002) ont mis en évidence qu'une gélification de la phase protéique provoquée par la séparation de phase dans des mélanges concentrés caséines-amylopectine figeait en apparence la microstructure dans les premiers temps de cette séparation.

Le comportement de phase est conditionné par la variation d'énergie libre du mélange, elle-même dépendante de la nature des (bio)polymères en présence, ainsi que leur composition initiale. Par réduction de cette énergie de mélange plus thermodynamiquement favorable, la dynamique qui régit le passage de mélanges hétérogènes et instables vers un état stable et biphasique peut être approchée par deux mécanismes, nommément (i) la décomposition spinodale (DS) et (ii) la nucléation et croissance (NC), en relation avec la position du mélange dans le diagramme de phase du système protéine-polyoside considéré (Butler et al., 2003 ; Clark, 1995). En effet, les domaines de co-solubilité et d'incompatibilité sont délimités par la binodale. Le domaine incompatible est lui-même subdivisé en deux zones par une autre courbe, la spinodale (**Figure 1.20**):

1. Etudes bibliographiques

- **Les mélanges situés au-dessus de la spinodale se sépareront spontanément par DS (i)**

De la réduction immédiate d'énergie libre du mélange, toujours négative et même pour des fluctuations très faibles de concentration, résultera forcément deux phases séparées sans qu'un apport d'énergie extérieur puisse s'y opposer. Une des singularités de la DS est la régularité des structures gouttelettes ou bi-continues rencontrées, en termes de taille et d'espace inter-structures (ou microdomaines).

- **Les mélanges situés entre la binodale et la spinodale sont qualifiés de métastables**

La variation d'énergie libre est négative à la seule condition que les fluctuations de concentration, plus importantes que précédemment, ont donné lieu à l'émergence de noyaux en solution. Ceux-ci sont stables à partir d'une taille critique et vont augmenter de taille, sinon ils sont redissolvent. Ce mécanisme est plutôt aléatoire et met en évidence des gouttelettes espacées irrégulièrement et de tailles largement polydisperses (Butler et al., 2003 ; Norton et al., 2001).

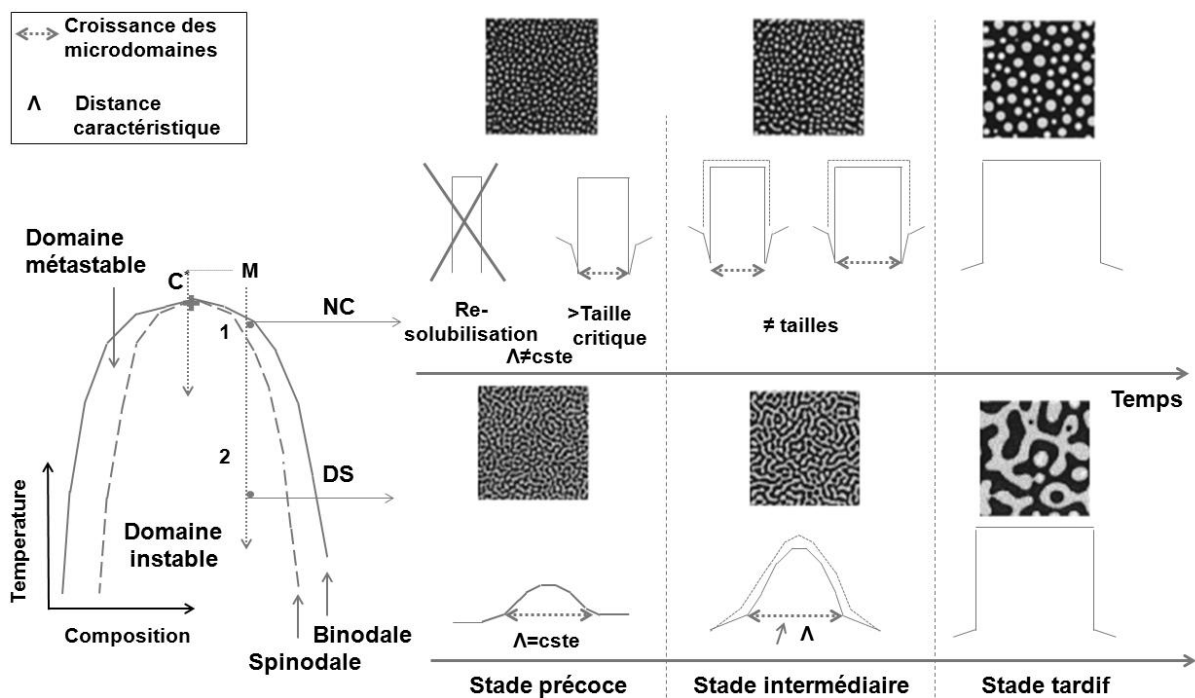


Figure 1.20 : Mécanismes et évolution de mélange se séparant par (1) : décomposition spinodale (DS) ; (2) : nucléation et croissance (NC) (d'après Butler et al., 2003 ; simulations informatisées : Chen & Chakrabarti, 1998).

La NC s'avère difficile à analyser, en raison de la proximité de la binodale avec la spinodale et du caractère très généralement polydisperse des biopolymères (Norton et al., 2001). En pratique et même pour des systèmes modèles, il n'est pas clairement établi si le

1. Etudes bibliographiques

passage de la NC à la DS sur le diagramme de phase est abrupt ou plutôt progressif (Verhaegh, Van Duijneveldt, Dhont & Lekkerkerker, 1996). En pratique, la DS est mise en évidence pour des mélanges suffisamment éloignés de la binodale par passage rapide des domaines co-soluble à instable, ou plus lentement à partir de la zone métastable proche du point critique C^* du diagramme de phase (Clark, 1995). Trois stades ont été décrits temporellement pour ces mélanges: les stades précoce (i), intermédiaire (ii) et tardif (iii). Au départ, les interfaces entre les deux phases immiscibles sont diffuses mais les surfaces de contact vont se réduire par la suite pour des raisons de réduction de l'énergie libre du mélange. Parmi les fluctuations de concentration, une en particulier va grandir en amplitude dans le temps plus rapidement que toutes les autres. Celle-ci peut être mesurée par une distance caractéristique ou longueur caractéristique de périodicité Λ dans la microstructure.

Au premier stade de la séparation de phase (i), la théorie de Cahn-Hilliard prédit que la tailles des microdomaines immiscibles formés initialement va rester fixe ; Λ est d'abord constant (Butler et al., 2003). La composition des microdomaines va se modifier en s'enrichissant en un des deux polymères du fait des effets ségrégatifs locaux. Microscopiquement, la morphologie du système se séparant apparaît enchevêtrée ou bi-continue, du fait des variations locales de densité de phase, et n'est observée en pratique que si la séparation de phase est fortement ralentie voir bloquée à ce stade (Clark, 1995).

Au stade intermédiaire (ii) et au dernier stade (iii), la croissance des microdomaines n'est plus linéaire et va suivre une distance caractéristique Λ qui va augmenter avec le temps. Cela est reflété par une fréquence spatiale mesurant les itérations dans la structure du mélange qui diminue en même temps qu'une augmentation du nombre de fois que cette même fréquence (son intensité) est détectée., la maturation de la microstructure obtenue aussi bien par NC que par DC suit une loi de puissance type $\Lambda(t) \approx t^\alpha$, et la valeur de l'exposant α dépendra du mécanisme de maturation, par coalescence des gouttelettes (microdomaines) ou murissement d'Ostwald (Butler et al., 2003 ; De Bont et al., 2004).. Suivant ces deux mécanismes de transport diffusif des composés, une valeur de 1/3 pour α est prédite. Des valeurs plus faibles peuvent être attribuées à une gélification du mélange qui ralentit et fige la séparation du mélange, finissant par atteindre une viscosité infinie. Des valeurs de α plus élevées sont possibles lorsque les tensions de surfaces entre phases immiscibles sont élevées et accélèrent par flux hydrodynamique la séparation de phase. Si le mélange reste à l'état liquide, la sédimentation de la phase la plus dense et le crémage de la moins dense sera observé (Butler et al., 2003).

1. Etudes bibliographiques

Expérimentalement, la diffusion de la lumière aux petits angles (Static Angle Light Scattering – SALS) et en complément la microscopie confocale permet de quantifier l'évolution de la microstructure de mélanges de biopolymères instables. (Butler et al., 2003, Clark, 1995 ; De Bont et al., 2004, ; Norton et al., 2001).

Induire la gélification d'un mélange instable permettrait d'obtenir des microstructures figées dans un état thermodynamiquement instable, corrélées à des propriétés de texture variées (Norton et al., 2001).

1.2.2. Les gels multi-composés de biopolymères

1.2.2.1. Classification

Annoncé dès le départ de cette présente étude, les propriétés gélifiantes des protéines peuvent être améliorées en présence d'un polyoside (Turgeon et al., 2001). Comme ces mélanges témoignent la plupart du temps d'une séparation de phase ségrégative, les interactions entre biopolymères en milieu liquide doivent être en premier lieu prises en compte. La gélification des protéines globulaires est le plus communément opérée par traitement thermique. La gélification de la phase polysaccharidique s'opère en présence de calcium pour des polyosides anioniques (Beaulieu et al., 2001 ; Donato et al., 2005 ; Neiser et al., 1999).

Les gels composites de biopolymères sont de trois types (Beaulieu et al., 2001 ; Tolstoguzov, 1995) :

- **Les gels « couplés » ou « complexes »**

Les réseaux sont interconnectés car les interactions entre biopolymères sont de type associatifs (ou faiblement répulsives).

- **Les gels « remplis »**

Un seul des deux biopolymères gélifie car l'autre et soit non gélifiant, soit il n'atteint pas sa concentration critique de gélification. Le biopolymère gélifiant forme soit un réseau continu qui englobe la phase dispersée (sous forme de gouttelettes) constituée de l'autre biopolymère non-gélifiant, soit des particules gélifiées sont dispersées dans la phase continue contenant le biopolymère non-gélifiant. Pour des mélanges où la concentration en protéines est trop faible par rapport à celle du polyoside, des particules protéiques vont s'agréger sans

1. Etudes bibliographiques

véritable organisation, donc avec une connectivité faible (Turgeon et al., 2001). Des effets de déplétion peuvent de plus favoriser l'agrégation protéique (Donato et al., 2005).

- **Les gels interpénétrés/mixtes**

Chaque biopolymère forme un réseau dans sa phase enrichie, de manière relativement indépendante. Des structures interpénétrées sont assez rares car elles concernent des mélanges compatibles. Plus souvent, des gels mixtes sont formés à partir de biopolymères incompatibles, avec une séparation de phase bloquée microscopiquement (Beaulieu et al., 2001 ; Donato et al., 2005). Il est à noter que la concentration seuil de gélification de chacun des biopolymères est plus basse en mélange incompatible qu'individuellement. D'une part, les effets ségrégatifs conduisent à un effet de concentration des biopolymères dans leur phase respective, supérieure à la concentration critique de gélification. D'autre part, le rapprochement des biopolymères du même type favorise des interactions attractives, notamment lorsque le chauffage du mélange génère une agrégation protéique. Dans ce cas, des effets de déplétion sont prévisibles pour des particules protéiques plus grosses, qui flocculent en conséquence. La gélification du biopolymère dans sa phase enrichie est alors plus prononcée. L'affinité de chaque biopolymère pour le solvant et l'évolution de celle-ci au cours de la gélification affecte le partage du solvant entre les deux phases (Tolstoguzov, 1995).

Selon les concentrations seuil de gélification et de séparation de phase, un système spécifique protéine-polyoside qui gélifiera pourra présenter un grand nombre de morphologies microstructurales en fonction de sa position dans le diagramme de phase préétabli (hors conditions de gélification) (**Figure 1.21**).

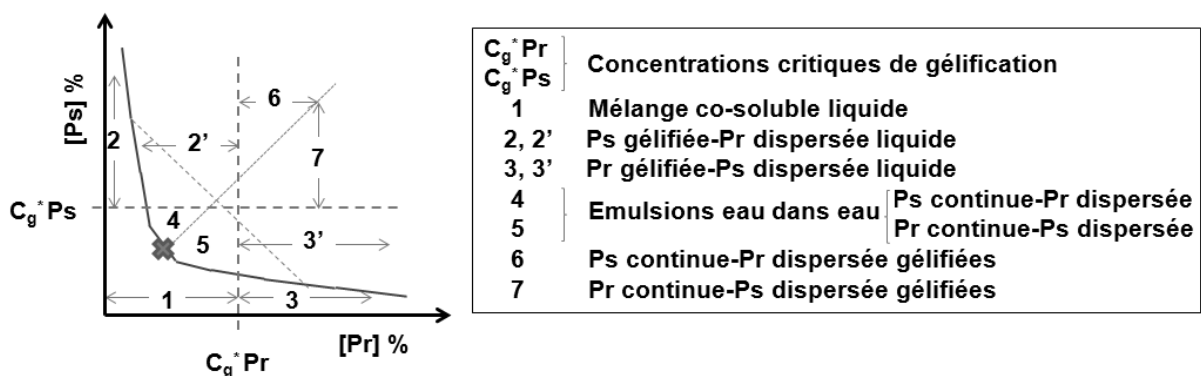


Figure 1.21 : Diagramme d'état et topologie des mélanges pour un système protéine (Pr)-polyoside (Ps), tous deux gélifiants (d'après Tolstoguzov, 1995).

1. Etudes bibliographiques

Cette présente topologie ne tient pas compte de la cinétique de séparation de phase, et des modifications des paramètres du solvant (extrinsèques) induisant la gélification. Des modifications des paramètres extrinsèques (du solvant) du système ternaire peuvent entraîner la gélification d'un des deux biopolymères, voire les deux. La température, le pH, la force ionique peuvent être modifiés plus ou moins graduellement. Des gels mixtes sont préparés le plus souvent par traitement thermique directement appliqué sur le mélange ou alors par acidification/ajouts de sels à froid dans les deux autres cas (Bryant et al., 1998).

1.2.2.2. Compétition cinétique de séparation de phase/gélification

Résultant de fluctuations locales de concentration de chaque biopolymère au voisinage des biopolymères non-similaires, l'augmentation de viscosité du mélange au préalable de la transition sol-gel (ou point gel) ralentit la cinétique séparation de phase et la bloque à un niveau plus ou moins avancé. Dans le cas des gels thermiques et pour des systèmes incompatibles, la gélification des microdomaines enrichis en protéines et l'aptitude à former un réseau dépendra notamment de la fraction volumique de la phase protéique dans le mélange (Beaulieu et al., 2001 ; Donato et al., 2005). La gélification de la phase polysaccharidique se réalise à froid, en présence de cations divalents dans le cas de polyosides anioniques types pectines faiblement méthylées ou alginates de sodium. D'une manière générale, l'ajout de cations ou une diminution du pH tend à masquer les charges négatives portées par les biopolymères et favoriser du moins leur rapprochement, sinon leur agrégation au préalable de la gélification. De manière similaire à des solutions de protéines seules, du niveau de répulsions électrostatiques dans le mélange dépendra les aptitudes des protéines à s'agréger. La turbidité du gel final sera révélatrice de microstructures plutôt fines (gels translucides) ou plutôt grossières, particulières (opaques) (Turgeon et al., 2001). L'intérêt des gels mixtes est une plus grande variété des microstructures et une meilleure capacité à la rétention d'eau occasionnée par le polyoside (groupements hydrophiles nombreux formant des liaisons hydrogène avec l'eau) que pour des gels protéiques seuls. Par contre, les caractéristiques de fermeté/élasticité du gel mixte dépendront du niveau de connectivité de chaque réseau (ou du seul réseau protéique pour des gels remplis), de leur extension et donc de leur prédominance.

Le choix des conditions expérimentales de gélification de systèmes protéine-polyoside vont donner lieu à des effets synergiques ou antagonistes par rapport à des gels de biopolymères seuls :

1. Etudes bibliographiques

- **Des effets antagonistes**

Le gel rempli/mixte a une fermeté moindre que les gels de biopolymères seuls aux mêmes concentrations initiales. La perte de connectivité au sein du (des) réseaux, l'inclusion de larges microdomaines polysaccharidiques ou la formation rapide d'un réseau étendu gênant le réseau protéique peuvent être des causes de perte de fermeté du gel final (Tolstoguzov, 1995). Un gel protéique est généralement plus fort car plus concentré et généré par davantage d'interactions (hydrophobes, voire échange de ponts disulfures) qu'un gel polysaccharidique, plus dilué et qui ne ferait intervenir que des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes. Pour des polyosides anioniques, des pontages salins sont également à prévoir.

- **Des effets de synergie**

Les gels remplis ou mixtes témoignent d'un gain d'élasticité par rapport aux gels de biopolymères seuls, plus que la simple addition des valeurs d'élasticités individuelles (le caractère élastique est directement lié au caractère de « solide » du matériau, étant donné que la plupart des gels de biopolymères sont dits « viscoélastiques » (état intermédiaire) (Grillet, Wyatt, & Gloe, 2012). Il est à noter que la gélification est due à des changements structurels/conformationnels d'un ou des deux biopolymères. Il s'ensuit alors une redistribution du solvant pour des questions d'affinité entre les deux phases, par rapport à un comportement de phase décrit dans des conditions de solvant fixes et spécifiques. L'enrichissement s'accompagne logiquement d'un abaissement du seuil de concentration critique de gélification protéique (Beaulieu et al., 2001 ; Tolstoguzov, 1995).

Lorsque la phase continue est constituée du biopolymère le « plus » gélifiant, la phase dispersée (gélifiée ou non) contenant l'autre biopolymère agit tel un occupant de l'espace. Des effets de synergie sont alors prévisibles par effets de volume exclu. Lorsque le mélange se rapproche du diamètre rectilinéaire, une morphologie bi-continue tend à affaiblir la structure du gel (Tolstoguzov, 1995). Les gels dont la fraction volumique du biopolymère le moins gélifiant augmente seront globalement plus faibles. De même, de forts effets ségrégatifs en augmentant la concentration du biopolymère le moins gélifiant tendraient à surconcentrer la phase enrichie biopolymère le plus gélifiant, accélérant sa gélification au sein d'une phase dispersée, moins connectée (Donato et al., 2005). Selon la force du gel que l'on aurait obtenu avec chaque biopolymère pris individuellement à la concentration correspondante dans sa phase enrichie, la fraction volumique de chaque phase déterminera si le gel mixte sera plus ou moins fort (Tolstoguzov, 1995). Le pH et la force ionique conditionnent le niveau de répulsions entre biopolymères et modifient leur aptitude à

1. Etudes bibliographiques

l'agrégation protéique/complexation de chaînes polysaccharidiques. Une augmentation de la force ionique, surtout si elle consiste en l'addition de cations divalents, a un rôle similaire à une diminution de pH et peut éventuellement générer des interactions ioniques non spécifiques inter-biopolymères (Neiser et al., 1999).

1.2.2.3. Gels thermiques de biopolymères : effets de la gélification du polyoside sur la structure à différentes échelles

Peu d'études se sont penchées sur la gélification de systèmes mixtes. Nous nous sommes intéressés aux cas où le polyoside (alginate, pectines) gélifie en présence de calcium

Des mélanges d'albumine de sérum bovin (SAB)-alginate de sodium en présence de calcium (Neiser et al., 1999), protéines de lactosérum ou albumine de sérum bovin (SAB)-pectines plus ou moins méthylées avec ou sans calcium ajouté ont été étudiés (Donato et al., 2005). L'effet de la concentration en polyoside sur l'agrégation protéique a été déterminé, en termes de taille, morphologie et niveau d'interconnexions du réseau protéique formés d'agrégats obtenus par traitement thermique. Ces mêmes auteurs ont décrit l'influence du pH, de la nature des sels ajoutés et de leur concentration (monovalent : Na^+ ; divalent : Ca^{2+}) pour différentes compositions initiales en protéine-polyoside.

- **Effets de la nature et teneur en sels sur la rhéologie de gels remplis/mixtes**

Neiser et al. (1999) ont comparé les forces de gels de SAB (8% - m/v)-alginate de sodium (1%) en fonction du pH, de la force ionique ainsi du ratio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ appliqué. L'ordre de gélification de chacun des biopolymères était modulé. Deux procédés (i, ii) ont été comparés : (i) La gélification de l'alginate s'opérait par libération du calcium, due à la dissociation acide de CaCO_3 en présence de GDL, au préalable d'une gélification thermique des protéines à un pH donné. Autrement (ii), les protéines étaient d'abord mises à gélifier thermiquement, puis le gel rempli était trempé dans un bain de CaCl_2 afin d'induire alors la gélification de l'alginate.

Les propriétés texturales des gels obtenus étaient évaluées par rhéologie aux faibles et grandes déformations. Les auteurs ont mis en évidence un maximum de fermeté pour les gels mixtes (en présence de 14 mM de calcium) par rapport aux gels remplis obtenus à une force ionique $I=75$ mM. Au-delà, la fermeté diminuait sensiblement. Cet optimum de force ionique était inférieur à 50 mM pour les gels remplis sans calcium. Des effets de salting-out pour la BSA étaient probables.

1. Etudes bibliographiques

Afin d'évaluer la contribution du réseau d'alginate à la fermeté du gel, un trempage dans une solution d'EDTA déstructurait le réseau de calcium-alginate et le gel après traitement avait une fermeté proche du gel rempli (sans calcium). Cependant, le trempage dans une solution de CaCl_2 des gels remplis donnait des gels plus fermes pour une même force ionique finale, que ceux obtenus d'abord par gélification (à froid, ionotropique) de l'alginate puis par chauffage et gélification des protéines. La formation de deux réseaux protéique et polysaccharidique renforçait clairement la structure globale du gel mixte, même si le profil de gélification en termes de cinétique indiquait que le réseau protéique était prédominant, au sein d'une phase continue. Un effet de synergie entre les deux réseaux était prévisible ; un pH inférieur à 6 et une force ionique faible favoriseraient des interactions associatives, affaiblissant le gel (complexes ne participant à aucun réseau), alors qu'un pH supérieur à 6 et une force ionique I de 130 mM induiraient plutôt une séparation de phase ségrégative (données expérimentales non montrées). Une moindre synergie et des renforcements locaux de la structure par effet de concentration ont été suggérés. Les gels mixtes restaient cependant moins fermes que les gels purement protéiques, probablement la présence d'une phase d'alginate dispersée, gélifiée ou non, réduisait la densité et la connectivité du réseau protéique.

- **Balance entre les concentrations initiales en protéine et polysaccharide en mélange : effet de l'ajout de calcium**

Donato et al. (2005) ont remarqué que l'élasticité de gels mixtes diminuait sensiblement pour des ajouts croissants en pectine faiblement méthylées à des solutions à pH 6.8 et 100 mM NaCl de BSA (2-8 %, m/m) chauffées par la suite jusqu'à 80°C, incubées pendant 30 min et refroidies à 20°C (**Figure 1.22**). Après refroidissement, les biopolymères occupaient deux phases séparées dans les gels finaux. L'ajout de calcium (3mM) permettait d'opérer la gélification de la phase enrichie en pectines lors du refroidissement du mélange, alors que la phase protéique avait déjà commencé à gélifier lors du maintien à 80°C. Les gels mixtes (en présence de calcium) obtenus présentaient une diminution d'élasticité plus marquée à partir de 0,4 % de pectinate, par rapport aux gels remplis (sans calcium). Il y avait ainsi contribution de deux réseaux de biopolymères, dont un réseau de pectine plus étendu gênait la formation du réseau protéique. Des concentrations élevées en pectinate (>0,4 %) tendaient à augmenter le niveau de séparation de phase, ainsi les particules protéiques agrégées gélifiaient plus rapidement dans des microdomaines plutôt isolés, inclus dans une phase continue polysaccharidique gélifiée donnant des gels faibles et plutôt viscoélastiques. La sur-

1. Etudes bibliographiques

agrégation protéique due au calcium réduisait le niveau d'interconnexions au sein de microdomaines protéiques plus grossiers, causant une diminution de l'élasticité du gel mixte par effet de salting-out. En revanche et pour de faibles ajouts en pectinate (0,2%), un réseau protéique dominait la microstructure à l'origine de gels plutôt élastiques. Dans ce cas, la force des gels mixtes était très proche de celle obtenue avec les protéines seules à la même concentration de départ.

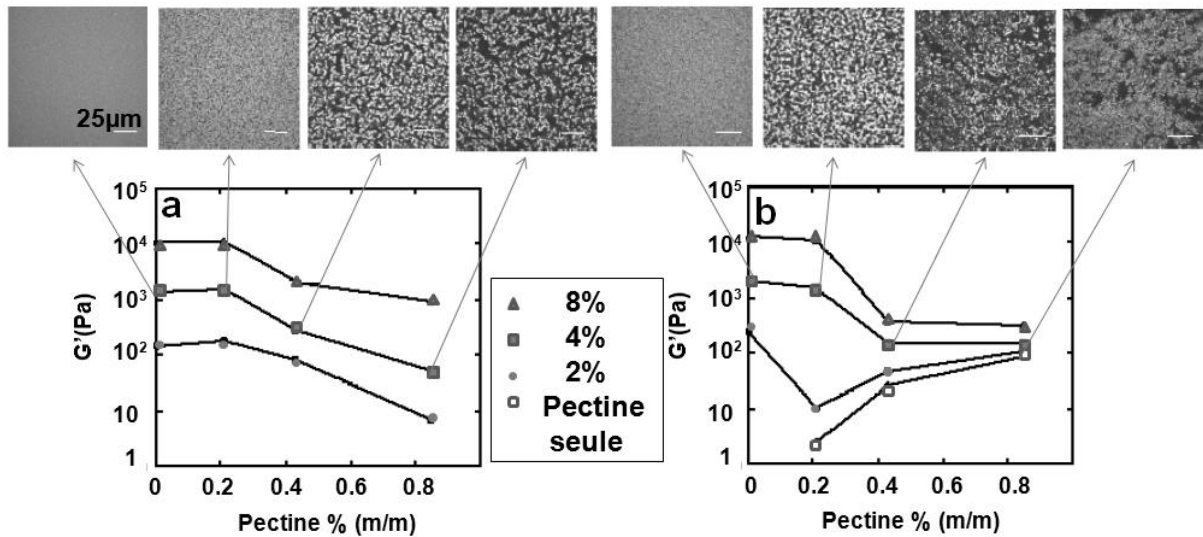


Figure 1.22 : Modules G' en fin de gélification à 20°C pour des gels thermiques de BSA (m/m) en présence de pectinates faiblement méthylées à différentes concentrations. Les clichés obtenus au MCBL pour des gels à 4% de protéines (les protéines marquées à la rhodamine isothiocyanate apparaissent en clair). (a) : Gels remplis (sans calcium) ; (b) : gels mixtes (avec 3 mM calcium) (d'après Donato et al., 2005).

- **Effets de la composition initiale en polyoside et en calcium : le partage du calcium au sein de gels mixtes**

L'effet de la concentration en calcium (0-10 mM) sur l'agrégation protéique dans des gels thermiques à pH 6 de protéines de lactosérum (8%, m/m)-pectines (plus ou moins méthylées, 1%, m/m) a été envisagé par Beaulieu et al. (2001). En l'absence de calcium, des gels remplis (pH 6) montraient des profils de gélification au cours du traitement thermique/refroidissement similaires à celui de la protéine seule, signifiant la prédominance du réseau protéique formé dans une phase continue. Une augmentation de la concentration en pectinate (0,5-1,5% (m/m)) résultait en une augmentation de la fermeté des gels remplis, du fait d'effets ségrégatifs plus prononcés renforçant l'agrégation protéique au cours du chauffage du mélange. En complément, une plus grande quantité de polyoside dans le mélange capturerait davantage de solvant au détriment de la phase protéique, qui s'agrégait plus fortement.

Des gels mixtes étaient obtenus par ajout de calcium (10 mM). Une compétition pour la liaison de celui-ci avait lieu entre les deux biopolymères. L'affinité du calcium pour les

1. Etudes bibliographiques

chaînes de pectinate était plus d'autant plus forte que leur degré de méthylation était faible. Il a été montré que des concentrations croissantes en pectines (comme précédemment), ainsi que des degrés de méthylation croissants augmentaient le risque de coagulation de la phase protéique par effet de salting-out en présence d'une concentration excessive en calcium, empêchant sa gélification. Rappelons que la coagulation protéique est une aggrégation désordonnée des protéines par écrantage rapide des charges, entraînant leur précipitation. Une plus forte concentration en polyoside (pectines faiblement méthylées) présentant d'autant plus une affinité plus marquée pour le calcium réduisait la fermeté du gel mixte en complexant davantage de calcium, pour la formation d'un réseau polyosidique étendu au détriment de celui de la protéine. La phase protéique formait alors des microdomaines granuleux faiblement interconnectés et dispersés dans une phase continue polyosidique.

- **Bilan : effets ségrégatifs et compétition pour la liaison du calcium dans les gels mixtes**

Les études ci-dessus nous exposent les effets de la nature et la composition en sels sur la gélification de systèmes mixtes. Une concentration trop élevée en polyoside, ainsi qu'un excès de calcium disponible pour la phase protéique a un effet défavorable sur la fermeté des gels, par forts effets ségrégatifs induits et sur-agrégation de la phase protéique (coagulation) au cours du chauffage du mélange. Ces facteurs résultent en une perte flagrante en connectivité du réseau du fait que les microdomaines soient dispersés et ont gélifié individuellement sans qu'un continuum n'ait pu se former. Par effets ségrégatifs à $\text{pH} \approx 7$, un réseau protéique étendu renforce davantage les gels qu'un réseau polyosidique, ainsi les conditions choisies pour l'obtention d'un gel ferme doivent clairement favoriser la formation d'un réseau protéique continu emprisonnant une phase polyosidique dispersée. Si l'on reprenait les considérations topologiques de Tolstoguzov (1995), l'agent gélifiant le « plus fort » serait plutôt la protéine et le « plus faible » le polyoside. Cela peut se comprendre d'une part pour des raisons de concentrations atteintes en pratique dans les phases coexistantes par des effets ségrégatifs (considérant un diagramme de phase type d'un système incompatible protéine -polyoside), et d'autre part par la multiplicité des interactions (non-spécifiques et spécifiques, voire formation de liaisons covalentes par échanges de ponts disulfures) qui entrent en jeu lors d'une agrégation thermique de protéines au sein d'une phase concentrée.

→ Les gels remplis ou mixtes décrits ci-dessus sont obtenus par chauffage. Dans l'optique d'assurer une plus grande flexibilité d'utilisation des gels multi-

1. Etudes bibliographiques

composés, il nous semblait évident de nous arrêter un instant sur des gélifications à froid, très peu documentées sur ces types de mélange.

1.2.2.4. Des mélanges gélifiés « à froid »

Comme décrit précédemment dans la **partie 1.1.1.9**, des procédés de gélification à température ambiante reposent sur la diminution lente des répulsions électrostatiques entre protéines pré-agrégées mais en présence d'un polyoside. Cette voie est encore peu étudiée pour des mélanges. La première étape de dénaturation des protéines en solution sous la concentration critique de gélification permettrait davantage de moduler la taille, la masse molaire, la morphologie, des particules agrégées. Le polyoside est ajouté à froid à la solution de globulines pré-agrégées thermiquement (De Jong, Klok et van de Velde, 2009). Il serait alors possible de jouer sur le niveau d'incompatibilité en faisant varier la taille des agrégats, avant de figer le système par gélification.

- **Des gels obtenus par acidification**

L'intérêt de cette méthodologie est de pouvoir jouer sur la cinétique de gélification, par exemple en modulant la vitesse d'acidification du système (De Jong et al., 2009). Similairement à des gels de protéines seules, l'acidification s'opère en présence de GDL, afin que le pH atteigne en une vingtaine d'heure un pH proche du pI des protéines. Des gels remplis de protéines de lactosérum pré-agrégées (préparées à 9% de protéines natives, m/m, 3% en mélange) -polyoside (sous 0,1 %, m/m) montraient un point gel à un même pH de $\approx 5,6$, indépendamment de la nature du polyoside. Cela traduisait la prédominance de l'agrégation protéique comme point de départ à la formation d'un réseau macroscopique. Encore une fois, une élasticité plus élevée des gels de biopolymères était liée à une plus grande continuité du réseau protéique. Ceci est évident vu les très faibles concentrations en polyoside utilisées dans cette étude.

La diminution des répulsions électrostatiques avant le point gel (à l'état liquide) peut abaisser le niveau d'incompatibilité, voire le cas échéant donner lieu à des complexes agrégats protéiques-polyoside. Alors que des effets de volumes exclus pour des biopolymères incompatibles seraient à l'origine d'une synergie au sein du gel, l'émergence de complexes inter-biopolymères aurait un effet antagoniste (Tolstoguzov, 1995). De plus, une plus lente acidification augmenterait le niveau de séparation de phase (point gel plus tardif), donnant lieu à une phase protéique plutôt grossière avec une continuité plus faible. Il est à noter cependant qu'une acidification trop rapide ne permettrait pas aux biopolymères d'adopter des

1. Etudes bibliographiques

conformations optimales pour des associations inter-protéines plus ordonnées (Cavallieri et al., 2008).

- **Des gels mixtes obtenus par addition de sels monovalents/divalents**

Avant d'opter pour un procédé de gélification à froid en particulier, une dernière étude a retenu notre attention, du fait que le système étudié était assez proche du notre. Pires Vilela et al. (2011) ont envisagé la gélification de protéines de soja agrégées en présence de gomme gellane (0,3-0,7%), par diffusion lente à travers une membrane de dialyse CaCl_2 -ou addition directe de KCl. Le polyoside seul était capable de complexer des cations monovalents/bivalents, donnant des gels durs et cassants (Nussinovitch, 1996). Les gels mixtes ont été comparés aux gels de protéines pré-agrégées seules (**partie 1.1.1.9**). Une lente diffusion du calcium donnait d'une manière générale aux réseaux de biopolymères suffisamment de temps pour s'organiser, donnant ainsi des gels macroscopiques légèrement opaques et donc de structure relativement homogène (Maltais et al., 2005). Par compression uniaxiale, les gels mixtes initialement à 3% de protéines obtenus présentaient des contraintes maximales à la fracture supérieures à celles obtenues pour des gels de protéines seules à des concentrations supérieures (6-8%), mais inférieures à celles mesurées sur des gels de gellane seule (0,3-0,7%). Au contraire, les gels mixtes présentaient une plus grande déformabilité à la fracture que les gels polyosidiques, mais moindre que les gels protéiques (**Figure 1.23**). Le calcium générait des ponts salins conférant rigidité et plus faible déformabilité au gel, mais dans le même temps réduisait par neutralisation totale des charges le nombre de liaisons hydrogène entre biopolymères et l'eau (diminution des forces de capillarité du gel). Une meilleure fermeté du gel à une concentration intermédiaire en polyoside (0,5 %) traduit une gélification d'un réseau protéique prédominant pour des effets ségrégatifs modérés et une séparation de phase bloquée plus rapidement qu'à 0,7% de concentration en gellane. La prédominance d'un réseau polyosidique pour un niveau plus prononcé de séparation de phase empêcherait la formation d'un réseau protéique interconnecté, ce qui aboutissait à une diminution de la fermeté du gel

Par enrichissement de chaque biopolymère dans deux phases séparées, les gels mixtes obtenus par diffusion lente présentaient une synérèse remarquablement réduite par rapport aux gels de protéines et de polyosides seuls. Ceci a été attribué à une structure plus compacte/interconnectée contenant des pores de solvant plus petits et plus également réparties. Les observations au MEB montrent par ailleurs qu'un gel protéique seul présentait une structure granuleuse, grossière et assez lâche (**1.23a**), et un gel de gellane au maillage

1. Etudes bibliographiques

particulièrement dense (**1.23b**). Concernant les gels mixtes obtenus par diffusion lente de CaCl_2 , deux réseaux coexistants respectivement de plus fin à plus grossier par une augmentant la concentration en gellane se sont développés dans deux phases séparées ont été observés, respectivement (**1.23c-d**). Par diffusion lente, des structures plus homogènes traduisent des réarrangements moléculaires plus lents qui tendent à des associations plus ordonnées. D'emblée, La méthodologie par ajout direct de KCl n'a pas été retenue car elle bloquait rapidement la séparation de phase, sans laisser de temps suffisant pour permettre des réarrangements moléculaires au sein des réseaux formés. D'après les auteurs, le réseau de gellane était dans ce cas prédominant, dispersant des agrégats protéiques sans connectivité apparente.

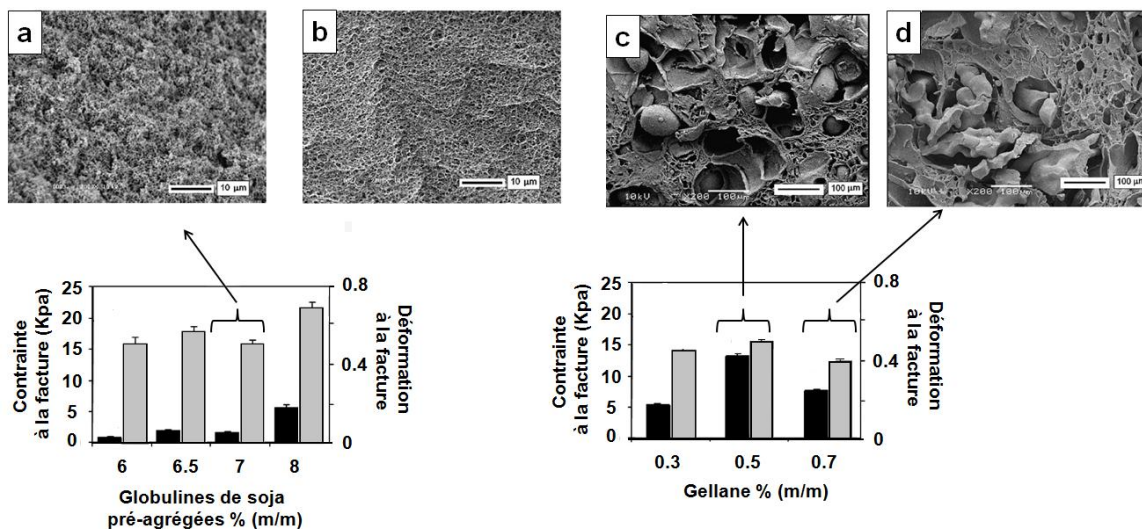


Figure 1.23 : relation entre la contrainte maximale à la fracture du gel et la microstructure au MEB pour des globulines de soja pré-agrégées seules ou en mélange (pré-dénaturées à 7,5%, diluées à 3% en mélange) avec de la gomme gellane. Les gels ont été obtenus par diffusion lente de calcium (barres noires) (a, c) par comparaison à un ajout direct de KCl (barres blanches) (b), force ionique $I=60$ mM dans les deux cas (d'après Pires Vilela et al., 2011). Barre d'échelle (a ; b) : $10 \mu\text{m}$; (c ; d) : $100 \mu\text{m}$.

➔ Le mode de gélification décrit ci-dessus ne permettrait pas une étude dans le temps de la gélification et pose probablement des problèmes de manutention des gels formés. Quant au contrôle de la vitesse de gélification, il pourrait se faire en jouant sur le ratio des volumes tampon salin-mélange de biopolymères lors de la dialyse « gélifiante », ce qui semble approximatif. Les méthodologies de gélification des mélanges de biopolymères par diffusion lente ou par ajout direct ne nous semblaient pas adaptées dans notre cas. L'alginate pose en effet le problème de la complexation quasi-instantanée du calcium (Jørgensen et al., 2007). Le risque serait d'une gélification très rapide à la surface au contact de la

1. Etudes bibliographiques

membrane, ce qui ralentirait ensuite la diffusion des ions jusqu'à cœur du mélange. Dans ce cas, le risque encouru serait une hétérogénéité de structure/fermeté du gel.

1. Etudes bibliographiques

2. Objectifs de l'étude

De l'audace, encore de l'audace, toujours de l'audace...

(G.-J. Danton)

2.1. Le choix d'un système multiphasique gélifié à froid

On s'est proposé d'opérer une gélification à froid sur un système aqueux globulines de pois-alginate de sodium, dans des conditions initialement incompatibles. Il s'agissait pour nous de comprendre comment notre système allait se structurer en fonction de (i) la composition initiale en biopolymères, (ii) de l'utilisation de protéines natives ou pré-dénaturées (iii) de la vitesse et du mode de réduction des répulsions électrostatiques au cours du temps, selon un procédé de gélification à froid. Rappelons que celles-ci s'opèrent généralement à des concentrations en sels et en protéines inférieures à celles rapportées dans les gélifications thermiques. L'ajout de sels lors de la dénaturation tend de plus à augmenter la température de thermo-dénaturation et donc un surplus d'énergie thermique à fournir (Sun et al., 2011).

En résumé de ce qui a été exposé ci-dessus, les gels mixtes formés de deux biopolymères gélifiants présentent les caractéristiques d'intérêt suivantes (Tolstoguzov, 1995) :

- ➔ La variété de microstructures complexes par rapport à des gels de protéines et/ou polyoside seuls, figées à différents niveaux de la séparation de phase par la transition sol-gel.
- ➔ La possibilité d'obtenir des gels à des concentrations moindres en biopolymères que s'ils étaient utilisés individuellement, car les effets ségrégatifs favorisent les interactions entre biopolymères de même type, sinon leur rapprochement par effet d'enrichissement.
- ➔ La possibilité de générer des co-gels (ou gels mixtes), de moduler l'ordre de gélification des biopolymères
- ➔ De meilleures capacités de rétention d'eau pour les gels protéiques en ajoutant un polyoside à haut caractère hydrophile (Beaulieu et al., 2001 ; Pires Vilela et al., 2011).

Ayant fait le choix d'utiliser l'alginate comme polyoside anionique, la gélification s'opèrerait en présence de calcium. **Nous avons donc mis en œuvre une gélification en masse similaire à ce qui se fait pour des solutions d'alginate seul, c'est-à-dire la libération *in situ* de calcium par acidification en présence de GDL** (Funami et al., 2009 ;

2. Objectifs de l'étude

Liu et al., 2003 ; Neiser et al., 1999). **Dans ce processus, notre singularité est de mettre en présence des protéines avec l'alginate avant d'opérer la gélification en masse.**

2.2. Plan des investigations (Figure 2)

2.2.1. Mélanges liquides - conditions non gélifiantes

Nous avons d'abord procédé à une caractérisation physicochimique des biopolymères utilisés en mettant l'accent sur la manière d'extraire les globulines de pois. Précisons qu'un protocole d'enrichissement en fractions séparées légumine 11S et viciline/convicine 7S a été développé. Néanmoins, la préparation (très) laborieuse en regard des rendements faibles ne permettait pas des études de formulation par criblage d'un grand nombre de compositions de mélanges. Nous nous sommes résolus de ce fait à élaborer la grande majorité de nos mélanges avec des globulines de pois non séparées. Notre frein principal résidait dans l'extraction assez longue de nos matières premières, aussi les quantités de biopolymères obtenues étaient restreintes d'une semaine à l'autre.

Notre système d'étude à 20°C globulines de pois-alginate (0,1 M NaCl et pH 7,2) n'avait pas encore été décrit précédemment. Il s'agissait pour nous de considérer dans un premier temps le comportement de phase à différentes échelles, macroscopique en termes de diagrammes de phase comme support cartographique des mélanges envisagées, et microscopique par observation par MCBL. Des protéines extraites avec un faible degré de dénaturation ont été utilisées. Dans un deuxième temps, l'effet d'une pré-agrégation des globulines sur ce même comportement de phase a été évalué. Cela a nécessité au préalable une étude de la dénaturation thermique des protéines, d'un point de vue interactions mises en jeu et taille des agrégats formés. C'est pourquoi l'extraction de celles-ci devait se produire ainsi avec un minimum de dénaturations involontaires.

2.2.2. De la gélification à la structure finale des gels

Nous avons alors procédé à la gélification à froid et en masse de nos mélanges globulines de pois-alginate au cours de la séparation de phase. L'évaluation des propriétés de structure consistait en une étude multi-échelles, partant d'observations macroscopiques (aspect...), mésoscopiques (rhéologie aux faibles déformations), microscopiques (MCBL) et moléculaires (MET).

2. Objectifs de l'étude

La **Figure 2** résume notre démarche :

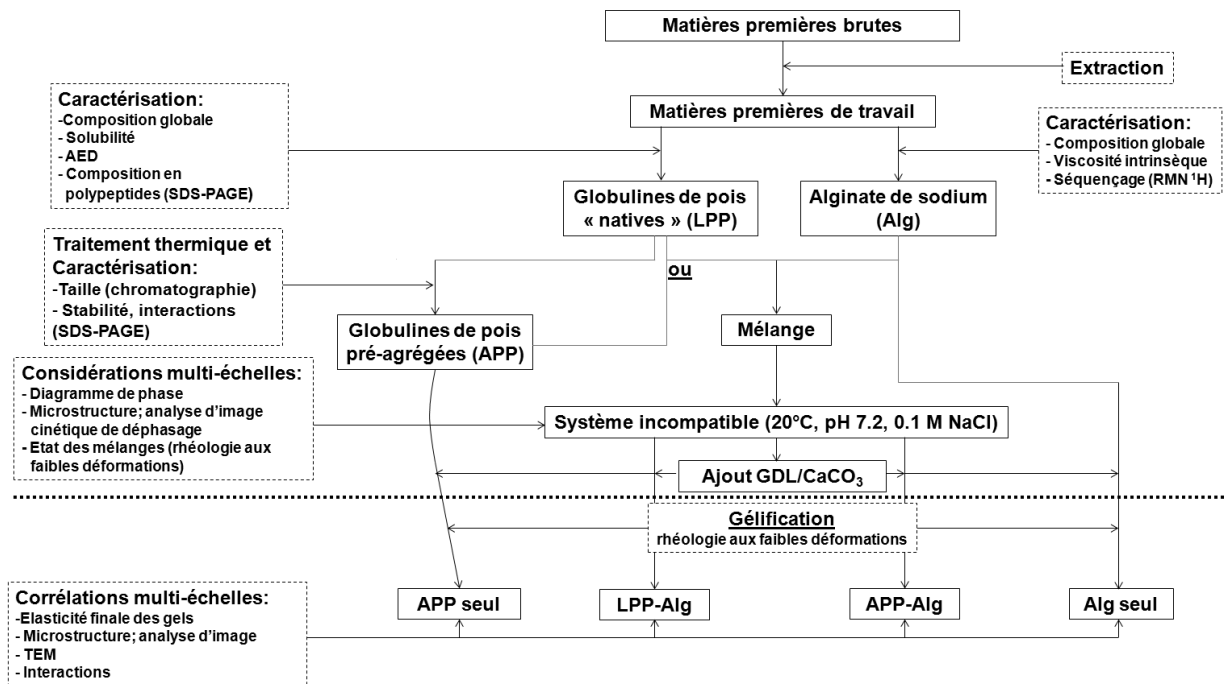


Figure 2 : Démarche expérimentale suivie dans la présente étude

Dès lors, abordons les expérimentations.

3. Matériels et méthodes

3. Matériels et méthodes

Dans un souci de clarté, nous avons fait figurer dans cette partie les protocoles expérimentaux principaux qui ont animé cette étude. La plupart de ces mêmes protocoles apparaissent également dans les articles constitutifs de la partie « Résultats et discussions ». Ainsi sont davantage décrits les principes des méthodes utilisées et la justification de leur choix.

L'ensemble des réactifs employés dans cette étude ont été fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, MO, Etats-Unis) avec une qualité analytique, excepté les graines de pois et l'isolat de globulines de pois (élaboré industriellement à partir du même lot de pois fourni) délivrés par Roquette SA (Lestrem, France).

3.1. Matériels

3.1.1. Matières premières et préparation des solutions mères

3.1.1.1. Les globulines de pois

Deux sources de protéines de pois étaient à notre disposition: soit des graines sèches de pois jaune (*Pisum sativum L.*), soit un isolat commercial (Nutralys[®] S85M). Les contenus bruts en protéines étaient de 26.89% pour les graines sèches et de 89% pour l'isolat (base masse sèche - MS). D'après le fournisseur, le contenu en globulines de l'isolat était supérieur à 95%. Un protocole d'extraction a été retenu pour l'obtention de globulines à un faible degré de dénaturation. La **Figure 3.1** résume ces étapes. Il est à noter que la farine de pois et l'isolat industriel présentaient des contenus en lipides extractibles et cendres de 1,30%, 2,2% et 4,98%, 5,1% (sur une base matière sèche), respectivement. **Les isolats de protéines globulaires de pois préparés en laboratoire à partir des pois et de l'isolat industriel seront désignés dans la suite par PPP et PPI, respectivement.**

3. Matériels et méthodes

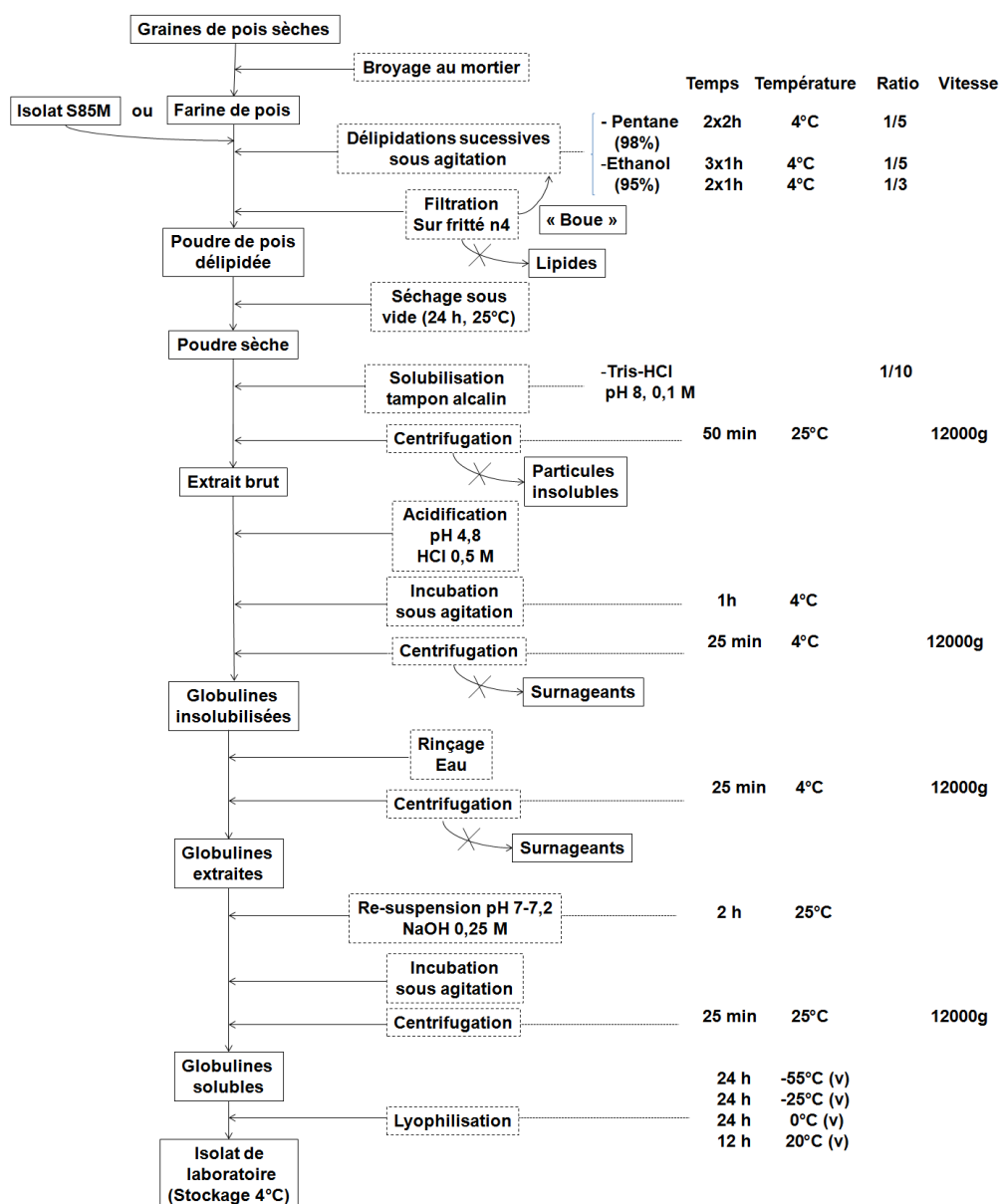


Figure 3.1 : Procédure d'extraction des globulines de pois

Ce protocole reprend des éléments de la **Figure 1.3** discutée dans la **partie 1.1.1.5**. Selon les étapes, les flèches barrées désignent les sous-produits éliminés.

Signalons que d'autres protocoles d'extraction ont été expérimentés (par ultrafiltration/diafiltration), ainsi qu'une séparation des deux fractions globulines légumine 11S et viciline/convicine 7S. Cependant, l'investissement en temps et les limitations techniques ne permettaient pas d'obtenir des quantités de matière suffisantes pour une étude de formulation.

3. Matériels et méthodes

3.1.1.2. L'alginate de sodium

La poudre d'alginate a été fournie par Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Celle-ci a été utilisée après purification selon un protocole défini par Panikkar & Brasch (1997), reposant sur une gélification de la solution d'alginate brute en présence de calcium, ressolubilisation en présence d'EDTA et standardisation de la composition en sels par dialyse extensive. La **Figure 3.2** illustre cette procédure. La poudre d'alginate de sodium purifié sera nommée par la suite Alg-Na.

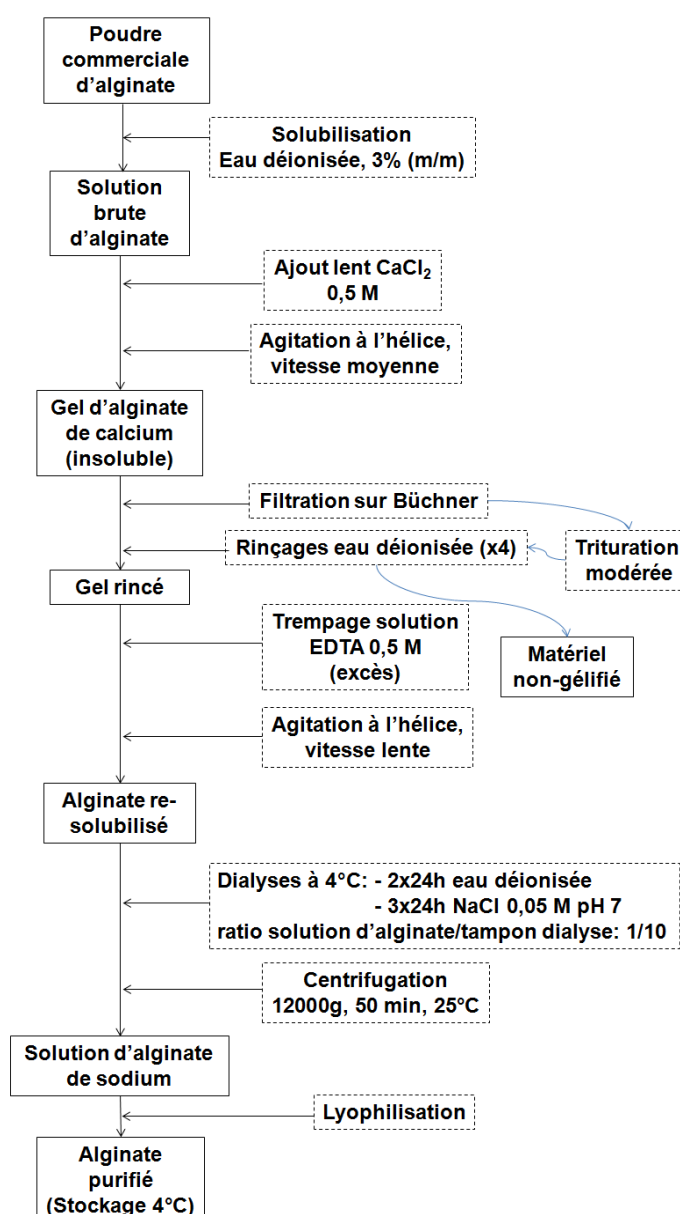


Figure 3.2 : Les étapes de la purification de l'alginate de sodium (d'après Panikkar et al.,1997).

3. Matériels et méthodes

3.1.1.3. Préparation des solutions mères

Les solutions mères de biopolymères ont été préparées séparément à partir des lyophilisats qui ont été obtenus précédemment.

La solution mère d'alginate de sodium Alg₀ a été préparée à partir d'Alg-Na en suivant le schéma de la **Figure 3.3a**. Celle-ci était incolore et limpide, contrairement à l'alginate commercial.

Deux types de solutions de globulines de pois ont été préparés. Dans une première partie, une solution PPN₀ de globulines de pois « natives » (du moins à un niveau faible de dénaturation suite à leur extraction) ont été obtenus à partir de PPI (**Figure 3.3b**). De la même manière une autre solution PPn₀ a été préparée dans une moindre mesure à partir de PPP, pour une première partie d'expérimentations (voir ci-après, **partie 4.1-2**). Puis dans une deuxième partie, une solution d'agrégats protéiques solubles **APP₀ a été élaborée par dénaturation thermique d'une solution de globulines « natives » PPN fixée à 8% (m/m) en protéines, à pH 7,5 ± 0,1 et sans sels ajoutés (Figure 3.3b')**. Un seul traitement thermique dénaturant a été expérimenté, ainsi la solution de globulines PPN (= LPP dans les **sous-parties 5.1.2 et 5.2.2**) a été (i) équilibrée à 40°C dans un bain d'huile minérale pendant 5 min, puis (ii) chauffée à raison de 4,5 ± 0,3°C/min de 40 à 90°C, (iii) maintenue à 90°C pendant 1 h et enfin (iv) plongée dans la glace pendant au moins 2 h. Le stockage s'est effectué à 4°C avant utilisation.

Par la suite, les solutions PPN₀, PPn₀ et APP₀ ont été conditionnées par dialyse (4 changements de tampon en 24 h), dans un environnement ionique fixe à pH 7.2 ± 0,05 et 0,1 M NaCl, tout comme la solution d'alginate Alg₀. Les solutions mères de biopolymères ont été stockées à 4°C entre chaque utilisation et n'ont pas été conservées plus de 4 jours. Les expérimentations s'effectuaient dans ce laps de temps. Les concentrations en biopolymères ont été déterminées par la suite. Dans les deux cas, les solutions de protéines étaient orangées et présentaient une légère turbidité dont on ne pouvait s'affranchir, malgré une délipidation extensive au préalable.

3. Matériels et méthodes

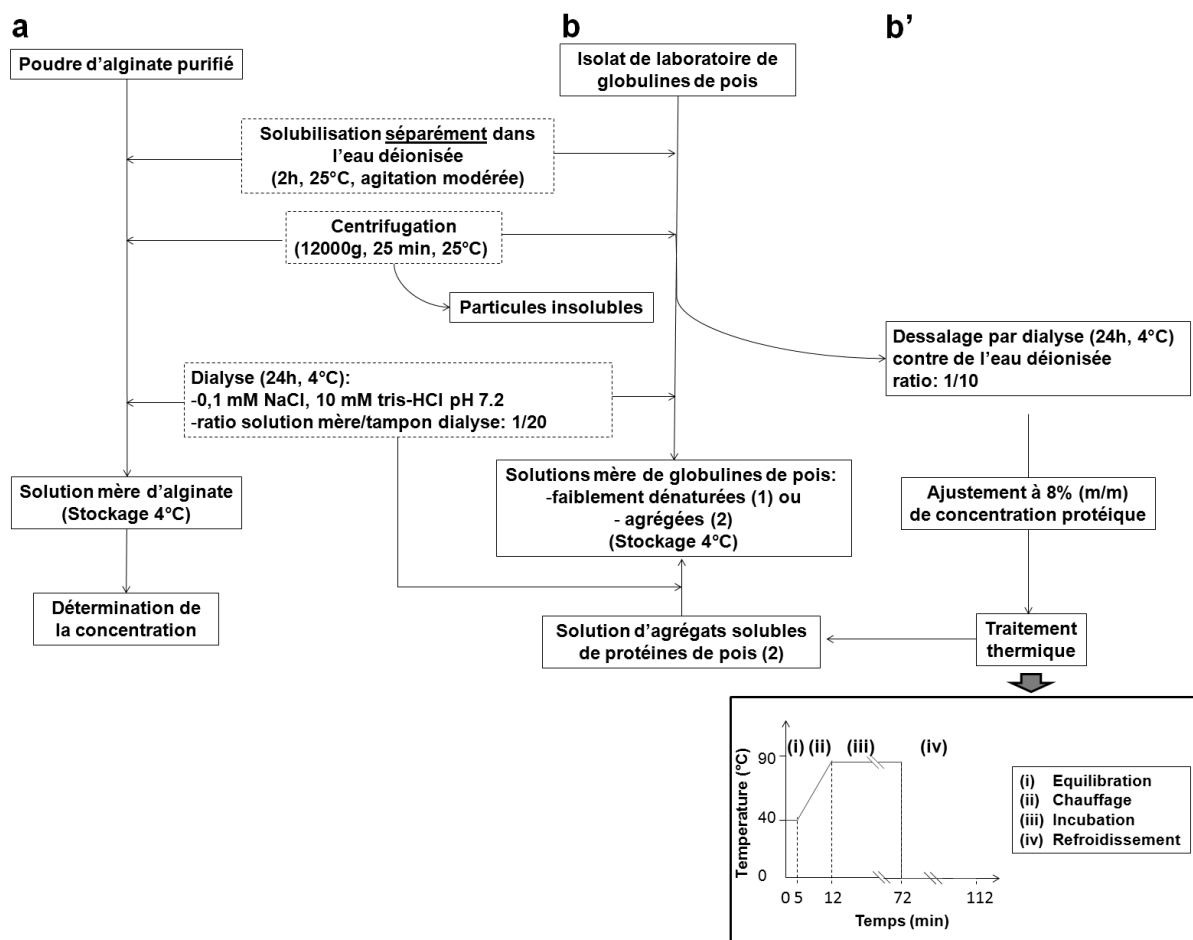


Figure 3.3 : Protocoles de préparation des solutions mères de biopolymères. (a) Alginate de sodium Alg_0 ; (b) et (c) : protéines globulaires de pois « natives » PPN_0 (ou PPn_0) (1) et pré-agrégées APP_0 (2), respectivement.

3.1.2. Préparation des mélanges

Les mélanges de biopolymères ont été préparés à température ambiante en mettant en présence différentes quantités des solutions mères (i) PPN_0 (PPn_0) et Alg_0 ou (ii) APP_0 et Alg_0 , une fois leur concentration déterminée après l'étape de dialyse (exprimée en % - $m/m_{solution}$). Un mélange est exprimé par un couple de concentrations protéine-alginate % (m/m). Protéine puis alginate et en complément le tampon de dialyse pour la dilution sont ajoutés dans cet ordre. Ainsi les mélanges ont toujours été réalisés dans 0,1 M NaCl et 10 mM tris-HCl, pour un pH initial de $7,2 \pm 0,05$. Le calcul des dilutions de chacune des solutions a été effectuée sur une base **masse et non volume**. Deux types de mélanges ont été étudiées : (i) des mélanges non-gélifiants et (ii) gélifiants :

3. Matériels et méthodes

3.1.2.1. Mélanges liquides globulines de pois natives/agrégées-alginate de sodium, dans 0,1 M NaCl, pH 7.2

La plupart du temps, des mélanges de 1 à 1,5g ont été formulés. Les solutions mères de protéines PPN ou PPA et d'alginate Alg sont par la suite mises en contact par agitation au vortex pendant 1 min à température ambiante. Les mélanges réalisés sont des couples de concentrations d'alginate généralement de l'ordre de 0,4; 0,8 et 1,2 % (m/m) et soit 2; 4; 8; 11 et 14% (m/m) pour les globulines natives, soit 2; 4; 6 % (m/m) lorsque les globulines pré-agrégées ont été utilisées. Il a été vérifié en parallèle que le pH restait stable pendant 3 à 4 jours d'expérimentations. Par la suite, l'ensemble des expérimentations s'est effectué à 20°C. La **Table 3.1** résume les mélanges étudiés, en conditions non gélifiantes :

Table 3.1

Formules des mélanges^a à 20°C (i) de protéines de pois natives (PPN, = LPP) - alginate de sodium (Alg-Na) ou (ii) de protéines de pois pré-agrégées (APP) - alginate en conditions non-gélifiantes.

Alg-Na% (m/m)	0,4	0,48	0,75	0,8	0,95	1,2
PPN (=LPP) % (m/m)						
2	2-0,4	NE	NE	2-0,8	NE	NE
4	4-0,4	NE	NE	4-0,8	NE	NE
8	8-0,4	NE	NE	8-0,8	8-0,95	8-1,2
11	NE ^b	NE	11-0,75	NE	NE	NE
14	NE	14-0,48	NE	NE	NE	NE
APP % (m/m)						
2	2-0,4	NE	NE	2-0,8	NE	NE
4	4-0,4	NE	NE	4-0,8	NE	4-1,2
6	6-0,4	NE	NE	6-0,8	NE	NE

^a Tous les mélanges ont été effectués dans 0,1 M NaCl, 10 mM tris-HCl, pH fixe de 7,2±0,05. ^b NE : non-étudié

3.1.2.2. Gélification de mélanges globulines de pois natives/pré-agrégées-alginate dans 0,1 M NaCl, pH initial 7,2

La méthodologie de gélification dans le cadre de cette étude consiste en une libération *in situ* de calcium ionique à 20°C, à partir d'un sel insoluble (CaCO₃ – CC) qui se dissocie avec le temps sous l'effet d'une acidification générée par l'hydrolyse de la GDL en acide gluconique (Neiser et al., 1999). Dans le cas de mélanges PPN-Alg et sans qu'il y ait eu de

3. Matériels et méthodes

traitement thermique particulier, l'alginate est le seul agent gélifiant en présence de calcium. Dans les mêmes conditions expérimentales, la question est de savoir si les globulines pré-agrégées sont capables de gélifier seules et/ou en mélange avec l'alginate. Les mélanges de biopolymères ont été élaborés comme décrit ci-dessus. La gélification est enclenchée suite à l'addition des poudres de GDL et de CC consécutive à la première agitation, puis à nouveau une ré-homogénéisation au vortex pendant 30 s. Une concentration fixe en GDL de 1% (m/m) a été testée en association avec une quantité de 10 ou 20 mM de CC. Les propriétés des mélanges gélifiés ont été comparées à celles de gels formés par un seul biopolymère, à la même concentration. La **Table 3.2** résume les mélanges soumis à une gélification :

Table 3.2

Formules des mélanges^a à 20°C (i) d'alginate seul (Alg), (ii) de protéines de pois natives (PPN)-Alg ou (iii) de protéines de pois pré-agrégées PPA-Alg en conditions gélifiantes, c'est-à-dire en présence de GDL et de CaCO₃ (CC).

Alg-Na % (m/m)	0	0,4	0,75	0,8	1,2
	B ₁₀ ; 20 ^b	0,4/10 ; 20	0,75/20	0,8/20	1,2/20
PPN % (m/m)					
8	Pas de gel	NE	NE	8-0,8/20	8-1,2/20
11	NE ^c	NE	11-0,75/20	NE	NE
PPA % (m/m)					
2	4/20	NE	2-0,8/10 ; 20	NE	2-1,2/20
4	6/20	4-0,4/10 ; 20	4-0,8/10 ; 20	NE	4-1,2/10 ; 20
6	Pas de gel	6-0,4/20	6-0,8/20	NE	NE

^a Tous les mélanges ont été effectués dans 0,1 M NaCl, 10 mM tris-HCl, pH initial 7,2±0.05, en présence de 1 % (m/m) de glucono-δ-lactone (GDL) et soit 10, soit 20 mM de carbonate de calcium (CC), comme spécifié dans le tableau. ^b Mélanges sans biopolymères (blancs B). ^c NE: non étudié

3.2. Méthodes

3.2.1. Caractérisation des biopolymères extraits

3.2.1.1. Méthodes de routine

- **Masse sèche (méthode 925.1, AOAC, 1990)**

Les échantillons à l'état lyophilisat (500 mg-1g) ou liquide (1-2g) sont pesés précisément dans une capsule en aluminium préalablement tarée, puis l'eau est évaporée pendant au moins une nuit dans une étuve chauffée à 102°C. La masse sèche est moyennée sur trois mesures.

- **Teneur en minéraux (méthode 923.03, AOAC, 1990)**

Les extraits secs des lyophilisats (500 mg-1g) ont été calcinés à 600°C, dans des capsules en porcelaine préalablement tarées, pendant au moins une nuit dans un four à cendres. La quantité de sels des échantillons est moyennée sur trois mesures.

Du fait du procédé de purification de l'alginate, le calcium résiduel a été déterminé en complément par absorption atomique de flamme.

- **Teneur/concentration en protéines de pois (méthode 920.87, AOAC, 1990)**

Celles-ci ont été déterminées par la méthode de Kjeldahl sur des solutions protéiques de 50 à 400 mg (pour une concentration minimale de 0,5%, m/m), ou 50 mg de poudre (\approx 20-85%, m/m sur base masse sèche) **utilisant le coefficient K de conversion azote-protéine du blé égal à 6,25** (AOAC, 1990). Les distillats ont été collectés pendant 2 min 30 dans 100 mL d'acide borique à 20 g/L. Une solution titrante de 10 mM de HCl a été employée la plupart du temps. Le dosage s'est effectué par mesure du pH, ainsi le volume équivalent de HCl a été relevé lorsque le pH est redescendu à la valeur de l'acide borique seul. La méthode a été calibrée en utilisant du nitrate d'ammonium.

- **Concentration en alginate**

Celle-ci a été mesurée par une méthode spectrophotométrique décrite à la base par Dische (1947), puis améliorée par Bitter & Muir (1962). Le principe de la méthode repose sur l'hydrolyse à chaud en présence d'acide sulfurique de polyosides composés d'acides uroniques, type acide glucuronique (xanthane, gomme gellane), galacturonique (pectines), guluronique (alginates...) (Melton & Smith, 2001). Les furfurals formés vont réagir ensuite en milieu acide avec un composé aromatique qui leur est spécifique - le carbazole - pour former un chromophore stable rose-fuchsia pendant un temps suffisant permettant le dosage.

3. Matériels et méthodes

L'utilisation de tétraborate de sodium lors du dosage permet (i) de détecter des quantités faibles d'acides uroniques (4-40 $\mu\text{g/g}$ solution), (ii) d'augmenter l'intensité de la coloration lors de la réaction, (iii), de stabiliser le chromophore pendant 16 h et (iv) d'améliorer la reproductivité (Bitter et al., 1962). Cependant, la réaction peut être perturbée par la présence d'oses neutres, notamment si les acides uroniques à doser sont relativement en faibles quantités. La droite de calibration a été effectuée avec de l'acide galacturonique (pureté >95%) dans un domaine linéaire de concentration de 25 à 100 $\mu\text{g/g}$ solution. Ainsi les solutions d'alginate ou échantillons à doser sont diluées dans l'eau déionisée pour figurer dans ce même domaine. Le dosage s'effectue dans des tubes en verre type Pyrex[®] (15 mL) avec des bouchons possédant un joint de téflon: à 2,5 mL d'acide sulfurique concentré (95%), contenant 25 mM de tétraborate de sodium préalablement dissous à 4°C, est ajouté dans la glace 500 μL de chaque solution de la gamme étalon et à doser. Un blanc est préparé en ajoutant 500 μL d'eau. Les tubes sont agités au vortex puis placés pendant 10 min dans un bain marie à 100°C. Lorsque les tubes ont refroidi à température ambiante, 100 μL d'une solution à 0,125% (m/v) de carbazole dans l'éthanol à 98% sont introduits, les tubes sont à nouveau agités au vortex et replacés dans un bain à 100°C pendant 15 min. Les tubes sont ensuite placés à l'obscurité pendant 3 h à température ambiante. La densité optique a été déterminée à 524 nm.

Il était possible que les parties osidiques des glycoprotéines puissent interférer ; il a été vérifié de ce fait que la présence de protéines à une concentration inférieure à 4-5 % (m/m) ne perturbait pas le dosage, d'autant plus que les solutions/mélanges contenant de l'alginate ont été diluées entre 200 et 400 fois.

3.2.1.2. Caractérisation physicochimique de l'alginate purifié

- **Viscosité intrinsèque $[\eta]$**

La viscosité intrinsèque renseigne sur le volume hydrodynamique moyen occupé par une macromolécule, pour des conditions de solvant précises (température, force ionique, pH) (Lai et al., 2002). Celle-ci peut être rapprochée à la conformation spatiale des chaînes en solution. Un viscosimètre capillaire Ubbelohde (constante de 0,009844, Schott-Geräte, Allemagne) plongé dans un bain thermostaté équilibré à 20°C permet de mesurer le temps d'écoulement dans le capillaire pour des solutions d'alginate diluées. Dans un premier temps,

3. Matériels et méthodes

la solution est aspirée par le capillaire puis remplit un réservoir en verre sphérique de quelques microlitres. La mesure s'effectue au moyen de deux photodiodes de part et d'autre du réservoir couplées à un chronomètre qui détectent, le passage du ménisque de la solution lorsque le réservoir se vide via le capillaire.

Une solution mère d'alginate a été préparée comme décrite précédemment, puis diluée entre 0,2 et 2,5 g/L avec le tampon de dialyse 0.1 M NaCl et pH 7,2±0,05. Le calcul de la viscosité cinématique η_{solution} consiste en la multiplication du temps de passage par la constante du viscosimètre (=0,009844). Puis la viscosité spécifique η_{sp} est déterminée suivant l'Equation (3.1) :

$$\eta_{\text{sp}} = \frac{(\eta_{\text{solution}} - \eta_{\text{solvant}})}{\eta_{\text{solvant}}} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

avec η_{solvant} la viscosité spécifique du tampon de dialyse. La viscosité intrinsèque $[\eta]$ est donnée par l'Equation (3.2) :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{sp}}}{c} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

En pratique, $[\eta]$ est mesurée graphiquement par la double extrapolation à concentration en alginate nulle (plus simplement, l'ordonnée à l'origine) suivant les équations de lissage de Huggins (Equation (3.3)) et Kraemer (Equation (3.4)) :

$$\frac{\eta_{\text{sp}}}{c} = [\eta] + k_{\text{H}} \times [\eta] \times c \quad (\text{Eq. 3.3})$$

$$\frac{\ln \eta_{\text{relat}}}{c} = [\eta] - k_{\text{K}} \times [\eta]^2 \times c \quad (\text{Eq. 3.4})$$

avec k_{H} et k_{K} les constantes de Huggins et de Kraemer, respectivement.

De plus, les paramètres S et B de tolérance au sel et de flexibilité, respectivement, de l'alginate purifié a partir des valeurs de $[\eta]$ qui ont été déterminées à 20°C à 4 concentrations en NaCl : 0,025, 0,05, 0,075 et 0,1M donnant les mêmes valeurs de force ionique I, respectivement, d'après l'équation (Equation 3.5) (Smidsrød et al., 1971). La concentration en NaCl du tampon de dialyse lors de la préparation d'Alg₀ a été ajustée en conséquence, et diluée avec les solutions de NaCl adéquates. Porter graphiquement les valeurs de $[\eta]$ en

3. Matériels et méthodes

fonction de l'inverse de la racine carrée de I permet de déterminer le paramètre S de tolérance de l'alginate (d'après **Eq. (1.3-4)**, voir **partie 1.1.2.5** ci-dessus).

$$I = \sum_{i=0}^n C_i * Z_i \quad (\text{Eq. 3.5}) \text{ avec}$$

I la force ionique totale (mol/L), C_i la concentration en ion i (mol/L) et Z_i sa valence.

- **Séquençage de l'échantillon d'alginate par RMN ^1H (voir Annexe A.7)**

La quantification des fréquences en blocs homopolymériques (sous forme de dimères et de trimères) F_{GG} , F_{GGG} et hétéropolymériques F_{MG} , F_{MGM} , F_{MGG} de l'alginate a été réalisée par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) à haut champ (600 MHz), dans D_2O , à 70°C , d'après la procédure décrite par Grasdalen et al. (1979, 1983). Etant donné le caractère épaississant de l'alginate, il est nécessaire de procéder à une hydrolyse acide douce en présence de 0,1 M HCl d'une solution d'alginate à 1% (m/m) portée à reflux. Autrement, la mesure conduirait à une surestimation des blocs GG. Le pH de la solution est d'abord abaissé à ≈ 5 pendant 10 min puis à ≈ 3 pendant 20 min. La solution est alors neutralisée avec 0,1 M NaOH, suivi précipité est filtré, séché à 70°C pendant une nuit, et ressolubilisé à 1% (m/m) dans D_2O . La mesure s'effectue par la suite dans l'enceinte de l'appareil préchauffée à 70°C .

3.2.1.3. Caractérisation des globulines de pois extraites

- **Courbes de solubilité en fonction du pH (AACC 46.23 (1982))**

La solubilité des globulines de pois PPN (=LPP) dans un domaine de pH allant de 3 à 8 a été mesurée en mettant en suspension de 25 à 50 mg d'isolat de laboratoire dans un volume d'eau, le pH ayant été modifié avec 0,1 M NaOH ou HCl avant de compléter à 10g de solution finale. Les solutions sont mises en agitation pendant 2 h à 4°C , le pH ayant été recontrôlé à la fin et le cas échéant, réajusté et remis en agitation. Les solutions sont alors mises à centrifuger (2500 g, 25 min, 25°C). Le contenu en azote (N) des surnageants a été obtenu par la méthode de Kjeldahl (**partie 3.2.1.1**). L'index de solubilité d'azote (Nitrogen Solubility Index - NSI) est calculé selon l'**Equation (3.6)** :

$$\text{NSI}(\%) = \frac{\% \text{ N dissous dans le surnageant}}{\% \text{ N initialement dans l'isolat}} * 100 \quad (\text{Eq. 3.6})$$

3. Matériels et méthodes

- **Analyse enthalpique différentielle (AED)**

L'AED est utilisée dans cette étude (voir **Annexe A.2**) pour (i) déterminer d'une part si le protocole d'extraction permettait d'obtenir des globulines avec un faible degré de dénaturation (autrement dit qu'elles conservaient au mieux leur structure native), d'autre part (ii) évaluer leurs propriétés thermiques, c'est-à-dire l'ensemble des changements conformationnels qu'elles subissent selon la cinétique de chauffage et enfin (iii) sélectionner un traitement thermique adapté de pré-dénaturation des globulines. Egalement l'addition de réactifs - au préalable de l'analyse - qui bloquent certaines fonctions ou qui tendent à déstabiliser des interactions au sein de la structure protéique renseigne sur la prédominance ou non de celles-ci au cours de la dénaturation (Choi & Ma, 2005, Sun et al., 2012).

Pour cela, (i) la température de début de dénaturation (ou d'initiation du déploiement de la structure protéique) T_{onset} , (ii) la température du pic (ou de dénaturation) T_d , (iii) l'enthalpie de dénaturation ΔH_d ont été mesurés en utilisant un calorimètre modèle Q20 (TA Instruments, Newcastle, DE, Royaume-Uni), calibré au préalable avec de l'indium. Les solutions de protéines avec une concentration et une quantité bien déterminée ont été introduites dans des capsules en aluminium, puis scellées hermétiquement. Une capsule vide servait de référence. Les échantillons sont ensuite chauffés avec une rampe de 10°C/min allant de 20 à 110°C. Le retour à 20°C s'est effectué par saut de température et équilibration (Shand et al., 2007, Sun et al., 2010). Pour chaque échantillon, un deuxième chauffage a été appliqué pour vérifier le caractère irréversible de la dénaturation. Puis dans un deuxième temps et afin de se rapprocher de la rampe de température utilisés pour la préparation de la solution de globulines pré-agrégées, le chauffage s'est opéré à 5°C/min (**partie 5.1.2**). Les thermogrammes ont été collectés et traités via le logiciel TA Universal Analysis Software. Pour chaque échantillon, trois répétitions ont été réalisées.

- **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse est une méthode analytique de séparation des protéines sur gel qui migrent selon leur charge et leur masse, suivant un champ électrique. Le gel est obtenu par réticulation de monomères d'acrylamide, qui forment un réseau dont la taille du maillage dépendra de leur concentration de départ. Les espèces protéiques migreront à la même vitesse dans un maillage lâche (4%, v/v), alors qu'un maillage de plus en plus fin (10-16%) retiendra les grosses protéines loin en arrière du front de migration, à l'opposé des plus petites.

3. Matériels et méthodes

L'électrophorèse permet non seulement d'identifier et de quantifier la composition protéique d'un échantillon complexe (ici des globulines de pois non séparées), mais aussi d'estimer les effets d'une dénaturation et d'en élucider les modifications d'interactions entre protéines agrégées, par comparaison avec les mêmes protéines « natives ». Cela dit, des protéines de haute masse moléculaire (>200 kDa) telles les globulines de pois ne pourraient entrer dans le gel sans un traitement pré-dénaturant au préalable. C'est pourquoi le dodécyle sulfate de sodium (SDS) en excès est utilisé. Il s'agit d'un puissant détergeant ionique qui se lie aux protéines par des interactions non-covalentes et qui entraîne de fortes répulsions électrostatiques inter- et intra-chaînes ; l'augmentation de la charge négative globale mène à une dissociation des sous-unités de protéines oligomériques et un déploiement complet des chaînes de polypeptides. Ainsi la structure quaternaire des globulines est rompue (dénaturation). Concernant des formes protéiques agrégées via des interactions hydrophobes, l'action dissociative d'un tensioactif comme le SDS libère les monomères constitutifs. Néanmoins subsistent les ponts disulfures. Ceux-ci peuvent être rompus par action d'un mercaptan, le dithiothréitol (DTT), qui réduit les ponts disulfures selon un mécanisme de SN_2 .

Les isolats et/ou solutions protéiques ont donc été analysés par SDS-PAGE, en présence ou non de DTT (Laemli, 1970). Un gel continu à 10% d'acrylamide (v/v) et 0,1 % de SDS (m/v) a été employé. Les échantillons protéiques, « natifs » ou dénaturés, prétraités chimiquement ou non, ont été dilués à 5 ou 8 mg/mL dans un tampon « échantillon » (62,5 mM tris-HCl, pH 6,8, 10% glycerol (m/v), 0,005% (v/v) bleu de bromophénol et 0,2% (v/v) SDS), puis déposés chacun au fond d'un puits d'un système d'électrophorèse vertical. La migration s'effectue à 10 mA, 185 V pendant \approx 6-8 h. Le tampon de migration contenait 25 mM de tris, 0,192 M de glycine et 0,1 % SDS (m/v). Des marqueurs de poids moléculaire (S8445, Sigma) sont placés dans un puits séparé. Les gels sont ensuite fixés pendant 1 h dans une solution de TCA à 12 % (m/v) pendant 30 min, puis fixés dans une solution contenant 25% (v/v) de méthanol et 0,25% (m/v) de bleu de Coomassie R-250, et enfin révélés dans une solution à 5% (v/v) de méthanol et 7,5% (v/v) d'acide acétique. Les gels décolorés sont scannés et l'analyse densitométrique des bandes a été effectuée avec le logiciel SigmaScan pro 5 (Systat Software Inc. V. 5).

- **Chromatographie par exclusion de taille**

Par cette technique, des macromolécules en mélange sont véhiculées par un tampon d'élution à débit fixé (phase mobile) et séparées selon leur taille/masse dans une colonne

3. Matériels et méthodes

contenant des billes de polymère de porosité variable (phase stationnaire). Les macromolécules de plus haute masse moléculaire auront le temps de séjour le plus court, alors que les plus petites emprunteront un chemin beaucoup plus tortueux à travers la phase stationnaire et seront en conséquence éluées plus tardivement. Du fait que l'électrophorèse ne pouvait pas renseigner directement sur la masse molaire réelle des globulines de pois à l'état natif ou pré-dénaturé, ce type de chromatographie (encore appelé filtration sur gel) constituait une méthode de choix. Le système était constitué d'un contrôleur Waters modèle 600s, d'une pompe 616 et d'un détecteur à barrette de diode 996 (Waters, une société Millipore, Milford, Etats-Unis). La colonne était un modèle Superdex 200 10/300 GL (10x300 mm - GE Healthcare, Uppsala, Suède). La colonne a été équilibrée avec un tampon d'éluion 0,05 M Na₂HPO₄ à pH 7.2 avec 0,05 M NaCl, et pré-calibrée avec des marqueurs de poids moléculaire (MWGF 1000-1KT 29-700 kDa, Sigma). Les échantillons protéiques ont été dilués à 0,8 ou 0,5 % (m/m) dans ce même tampon d'éluion. Le débit d'éluant était fixé à 0,4 mL/min. Des volumes d'échantillon de 50 µL ont été injectés au moyen d'un carrousel Waters 717.

3.2.2. Caractérisation des mélanges de globulines de pois-alginate de sodium

3.2.2.1. Diagrammes de phase

Différents diagrammes de phase ont été établis à 20°C pour des globulines de pois, séparées ou non, « natives » (PPN) ou pré-agrégées (PPA), en mélange avec l'alginate (Alg) de sodium, polyside anionique de son état. Les paramètres du solvant sélectionnés restent fixés à 0,1 M NaCl et 10 mM tris-HCl, pH 7,2±0.05. L'étude macroscopique du comportement de phase repose sur la formulation d'un grand nombre de mélanges de 1 à 2 g à différentes concentrations initiales (sur une base de concentrations **massiques, partie 3.1.1.2, Table 2.1**). Chaque mélange a été au moins dupliqué. Après agitation, les mélanges sont laissés au repos une nuit à 20°C. Ensuite les tubes sont centrifugés extensivement à vitesse modérée (2500g, 4 x 30 min, 25°C) pour accélérer la séparation de phase, jusqu'à ce que les volumes des deux phases soient fixes. Une vitesse modérée a été choisie pour éviter la sédimentation de la phase protéique. Il a été montré qu'une vitesse supérieure à 4000g n'influençait pas le volume des phases (Simonet, Garnier, & Doublier, 2000). La plupart des

3. Matériels et méthodes

mélanges montraient une séparation de phase détectée visuellement et repérée par un trait marqué au stylo sur le tube. La phase du haut a été prélevée avec précaution avec une pipette et pesée. La masse de la phase du bas a été obtenue par différence avec la masse initiale. La composition en biopolymères dans la phase du haut a été déterminée par les méthodes de Kjeldahl et acide sulfurique-carbazole pour les protéines et l'alginate, respectivement (**partie 3.2.1.1**). Pour la phase du bas, la concentration en protéines a été déterminée soit par dosage, soit par différence entre la concentration initiale et celle dans la phase du haut. La concentration en alginate a été évaluée par différences ; l'alginate étant dilué dans une phase

très concentrée en protéines, il n'était pas possible de réaliser des mesures par la méthode acide sulfurique-carbazole, du fait du brunissement par action de l'acide sur les protéines.

Sur le diagramme de phase final sont portés les points de mélange de départ et les compositions en biopolymères dans les deux phases séparées, joints tous trois par une droite de conjugaison. La courbe binodale est tracée manuellement en joignant les extrémités des droites de conjugaison correspondantes aux phases coexistantes à l'équilibre (Tolstoguzov, 1995).

3.2.2.2. Mesures rhéologiques

Un rhéomètre oscillatoire à faibles déformations de type SR-5 (Rheometric Scientific, Piscataway, NJ, Etats-Unis) a été utilisé dans cette étude avec une géométrie plan-plan (diamètre 25 mm), afin de caractériser les propriétés viscoélastiques des mélanges à l'état liquide ou en conditions gélifiantes. Dans tous les cas, **la température a été maintenue constante à 20 °C** au moyen d'une unité Peltier connectée au plateau bas du rhéomètre. Les mélanges sont préparés comme indiqués dans les **parties 3.1.2.1-2**, prélevés immédiatement (≈ 1 mL) après agitation avec une pipette et déposés sur le plateau bas. Aussitôt la géométrie est abaissée jusqu'à un entrefer de 500 μm . Les bords de l'échantillon sont alors recouverts d'huile minérale pour éviter l'évaporation d'eau au cours des mesures (**Figure 3.4**).

3. Matériels et méthodes

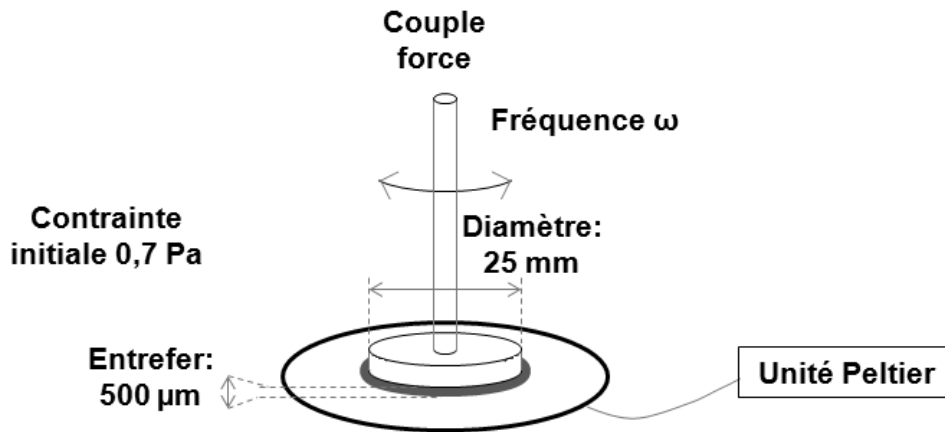


Figure 3.4 : Géométrie plan-plan utilisée lors des mesures rhéologiques aux faibles déformations

L'évolution des modules de stockage G' , de perte G'' et le profil de $\tan \delta = G''/G'$ a été enregistrée à 20°C par l'intermédiaire du logiciel RSI Orchestrator (V.6.5.8). Trois types de mesures ont été effectués afin de déterminer les propriétés viscoélastiques de plusieurs mélanges :

- **Mélanges non-gélifiants (sans CC et GDL)**

Soit (i) un balayage en fréquence a été réalisé entre 10 et 0.06 rad/s pour déterminer les propriétés viscoélastiques, soit (ii) un balayage dans le temps a été suivi à une fréquence fixe de 1 rad/s. et une contrainte initiale fixée à 0.7 Pa. Le domaine linéaire a été vérifié avant et après les mesures rhéologiques.

- **Mélanges en conditions gélifiantes (en présence de CC et GDL) (et solutions de biopolymères seuls)**

Le développement (i) de G' , G'' et $\tan \delta$ a été suivi par un balayage dans le temps généralement pendant 16 h à une fréquence de 1 rad/s et une contrainte initiale de 0,7 Pa. Lorsque les modules s'avéraient pratiquement stables lorsqu'ils fluctuaient à $\pm 10\%$ autour d'une valeur moyenne pendant au moins 1 h, (ii) un balayage en fréquence a été réalisé ensuite entre 50 et 0,06 rad/s. Le domaine linéaire (iii) a été vérifié par un balayage en contrainte (0,3-100 Pa) avant et après les mesures. Une contrainte initiale de 0,7 Pa convenait dans tous les cas. Cependant il a fallu augmenter celle-ci entre 1 et 2,5 Pa pour certains mélanges afin de gagner en sensibilité au cours de la gélification, sinon les valeurs de G'' pouvaient sembler quelque peu instables. Une telle augmentation ne perturbait pas la

3. Matériels et méthodes

gélification. Lorsque la stabilité de mesure des deux modules nécessitait une contrainte un peu plus élevée, le balayage en fréquence (ii) consécutif a été réalisé à la contrainte sélectionnée en fin de gélification, sinon à 0,7 Pa.

3.2.2.3. Etudes de microstructure par MCBL

L'appareillage utilisé pour ces investigations à l'échelle microscopique est un microscope confocal à balayage laser de type Nikon modèle Eclipse TE-2000, en mode fluorescence. La source de lumière est un laser néon-argon. Le principe général de fonctionnement est décrit en **Annexe A.4**.

- **Marquage des biopolymères**

Les globulines de pois, "natives" (PPN ou PPn) ou pré-dénaturées (APP) ont été marquées de manière non-covalente et non-spécifique en ajoutant pour 1 mL de solution mère 10 µL d'une solution aqueuse de rhodamine B isothiocyanate (RITC, à 1 mg/mL), suivie d'une agitation à l'obscurité et à 4°C pendant au moins 1 h. Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation étaient 543 nm et comprises entre 560 and 590 nm, respectivement. La RITC se fixe aux protéines via des interactions hydrophobes, aussi des ajouts modérés ne modifieraient pas (ou très peu) la structure des protéines (vérifié par la suite) (Donato et al., 2005).

- **Préparation des échantillons**

Dans les conditions non-gélifiantes, les mélanges de globulines de pois natives (PPN) ou pré-dénaturées (APP) marquées avec l'alginate sont préparés à 20°C comme expliqué dans la **partie 3.1.2.1**. Immédiatement après agitation, un volume de 20 µL est prélevé à la pipette et déposé sur une lame de microscope, ensuite recouverte délicatement par la lamelle. Les observations sont entreprises aussi vite que possible.

Dans les conditions gélifiantes, la procédure est décrite dans la **partie 3.1.2.2**. Lame et lamelle sont soudés hermétiquement par du vernis à ongle. La gélification sous lame se produit pendant une nuit à l'obscurité, à 20°C. La microstructure finale des gels est observée le jour suivant.

- **Acquisition des images et analyse**

3. Matériels et méthodes

La grande majorité des images a été prise à un grossissement de 20 fois pour une résolution de 512x512 pixels. Elles sont ensuite converties à un format 8 bit, ainsi les niveaux de gris s'échelonnent de 0 (noir) à 255 (blanc). Des corrections ont été opérées afin d'éliminer un maximum de bruit, de rectifier l'intensité du fond de l'image et d'en améliorer son contraste en utilisant le logiciel Image J (v. 1.45).

Du fait qu'une simple observation visuelle ne permettait pas de distinguer objectivement les microstructures rencontrées, des traitements mathématiques des images ont été entrepris selon le(s) phénomène(s) qui ont conduit à la morphologie de structure observée. Il s'agissait de considérer soit (i) des aspects dynamiques au sein des mélanges, soit (ii) de quantifier des données structurales pour un système figé. Les images obtenues n'étaient pas uniformes et mettaient donc en évidence une « texture », correspondant à une organisation spatiale des pixels propre au mélange observé. Les analyses décrites ci-dessous ont toutes été menées avec le logiciel Matlab (The Mathworks, Inc., v.7.5.0.342).

- **Evolution de la microstructure dans le temps pour des mélanges liquides**

Dans le cas des mélanges non-gélifiants, les images ont été prises au moins toutes les 30 secondes ou chaque minute pendant une durée 30-35 min. La transformée de Fourier à 2 dimensions est une procédure qui permet de détecter la répétition d'une fréquence spatiale F particulière au sein de la microstructure. Le spectre de puissance obtenu est moyenné radialement en 1 dimension. L'apparition d'un maximum de pic d'intensité dans le domaine

des basses fréquences est relié à une distance caractéristique Λ qui évolue dans le temps, théoriquement suivant une loi de puissance (**partie 1.2.6**) (Clark, 1996). L'analyse a été effectuée sur au moins trois répétitions de chaque mélange APP - Alg considéré (**Tableau 3.1, partie 3.1.2.1**).

- **Mélanges en conditions gélifiantes**

L'évolution dans le temps de la microstructure au cours de la gélification a été suivie qualitativement mais n'a pas donné lieu à une analyse plus poussée pour des raisons de la longue durée d'utilisation. A signaler également que l'exposition répétée des mélanges au laser du microscope résultait en une diminution de la fluorescence par blanchiment des protéines marquées. L'analyse d'image a plutôt porté sur la microstructure finale des mélanges et a nécessité la prise d'au moins 25 clichés.

3. Matériels et méthodes

Dans un premier temps, la fraction volumique Φ de la phase protéique a été estimée par le rapport de la surface totale des zones fluorescentes ramenée à la surface totale de l'image. Ceci s'est réalisé par application d'un filtre d'intensité de niveaux de gris avec le logiciel Image J pour sélectionner les zones fluorescentes.

Puis dans un deuxième temps, la méthode de cooccurrences a été utilisée (voir **Annexe A.6** concernant le principe de l'analyse). Une telle analyse a été rapportée dans une étude précédente sur des gels remplis/mixtes de SAB - pectines faiblement méthylées, en présence ou non de calcium (Donato et al., 2005). Seulement les paires de pixels adjacents ont été prises en compte. Dans la suite, le terme d'« objets » dans l'image désigne des zones dispersées (claires lorsqu'elles correspondent à des microdomaines protéiques fluorescents, sombres quand il s'agit d'inclusions de polyoside non marqué) dans une phase continue de niveau de gris moyen bien distinct.

Des paramètres statistiques sont tirés de la matrice de cooccurrences, calculée à partir de l'image. Ceux-ci ont été définis par Haralick (1979). Ceux-ci rendent compte de la distribution des pixels les uns par rapport aux autres et permettent par la suite de distinguer objectivement les microstructures observées : (i) « contraste » : la valeur est d'autant plus élevée que les variations locales de niveau de gris sont grandes dans la matrice de cooccurrence, en particulier pour un grand nombre de petits « objets » dispersés ; (ii) « corrélation » : une valeur élevée traduit de grandes zones ou « objets » de même niveau de gris ; (iii) : « énergie » : aussi appelé « uniformité », ce paramètre est calculé à partir de la somme des éléments au carré de la matrice de cooccurrence, une valeur de 1 est obtenue pour une image parfaitement homogène ; (iv) « homogénéité » : aussi appelé « moment différentiel inverse », il mesure la proximité de la distribution des éléments de la matrice de cooccurrence par rapport à une matrice diagonale, une valeur de 1 est effectivement obtenue pour une matrice de cooccurrence diagonale.

Une analyse en composantes principales (ACP) des paramètres mesurés est effectuée par la suite (Jolliffe, 2002). Ainsi le nombre de paramètres est réduit à deux nouveaux paramètres synthétiques appelés « composantes principales », qui permettent d'expliquer dans une projection simplifiée à deux dimensions au moins plus de 85% de la variance entre les « individus ». Une classification des microstructures d'images se rapportant à une formule spécifique d'un mélange APP-Alg gélifié est alors possible.

Quelque soit la direction choisie des pixels adjacents, il a été vérifié que les images n'avaient pas d'orientation particulière.

3. Matériels et méthodes

3.2.2.4. Etude de l'ultrastructure par MET

L'ultrastructure interne de trois gels a été investiguée ; APP seul 4/20, et mélanges gélifiés APP-Alg 4-0,4/20 et 4/1,2/20. Les mélanges (1,5 g) ont été préparés dans des tubes eppendorf et ont été mis à gélifier à 20°C pendant une nuit, comme indiqué dans la **partie 3.1.2, Table 2**. A partir des échantillons gélifiés, des tronçons (3x5x5 mm) ont été obtenus par découpe avec une lame de rasoir, puis fixés pendant 3 h par trempage dans une solution à 3 % (v/v) de glutaraldehyde et 2 % (m/v) de paraformaldehyde dans un tampon de phosphate de sodium dibasique à 0,1 M, pH 7. Il n'a pas été noté de solubilisation du gel malgré la présence des phosphates qui auraient pu complexer éventuellement le calcium dans le gel. Les tronçons de chaque gel fixé sont ensuite rincés cinq fois avec le même tampon phosphate à 4°C (1). Une post-fixation est réalisée en présence de 0,5% (m/v) de tetroxyde de sodium dans le même tampon phosphate à 4°C pendant 1 h. Les tronçons post-fixés sont alors re-rincés comme lors de l'étape (1). Puis les tronçons sont déshydratés par des bains successifs dans une série de bains d'alcool à concentration croissante en éthanol: 30% puis 50% (v/v) à 22°C pendant 30 min, 70% à 4°C pendant une nuit, et enfin 70 pendant 10 min, 90 pendant 30 min et 100% pendant deux fois 30 min à 22°C. Les tronçons sont redécoupés en pseudo-cubes de 1 mm de côté, et plongés dans un bain d'hydroxyde de propylène pendant 1 h à 22°C. L'imprégnation dans de la résine EPON (Embed 812, EMS, Royaume-Uni) s'effectue par une série de bains à 22°C, à concentration croissante en résine diluée dans l'hydroxyde de propylène : 33% (v/v) pendant 3 h, 50% pendant une nuit, 67% pendant 5 h et 100% deux fois pendant 5 h puis 16 h en ayant changé le bain entre deux. La polymérisation s'effectue à 60°C pendant trois jours. Les « lingots » polymérisés contenant les échantillons sont alors polis et tranchés en coupes ultrafines (≈ 90 nm). Une partie des ultrafines a été collectée sur des grilles en cuivre et marquées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Une autre partie des coupes ultrafines a été collecté sur des grilles en or et les parties osidiques de l'échantillon possédant des fonctions vicinal glycol en 1 \rightarrow 3 ont été marquées selon la méthode acide périodique-thiocarbohydrazide-argent (PATAg) (Hall, 1991). Un démarquage a été effectué à l'eau oxygénée pour s'assurer que des structures autres que les polyosides ne réagissaient pas positivement au PATAg. Les grilles ont été observées au moyen d'un MET

Hitachi H600 fonctionnant à 80 kV de tension d'accélération.

**4. Un système incompatible globulines de
pois « natives » – alginate; de la
séparation de phase à la gélification à
froid**

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

Dans cette première partie de résultats, nous allons d'une part (i) caractériser la composition et certaines propriétés physicochimiques des globulines de pois et de l'alginate, et d'autre part (ii) décrire le comportement de phase de mélanges à différentes échelles d'observation. Les deux **parties 4.1 et 4.2** condensent les résultats qui ont été mis en exergue dans deux études publiées, à savoir (i) le choix d'une méthode d'extraction des globulines de pois, et (ii) le comportement de phase de mélanges globulines de pois (quasi-) natives - alginate en termes de diagramme de phase et de données de microstructure (Mession et al., 2012_{a,b}). Quelques données complémentaires ont été ajoutées relatives aux caractéristiques structurelles de l'alginate purifié. Puis dans une **partie 4.3**, nous allons envisager (iii) un mode de gélification *in situ* d'un tel système incompatible.

4.1. Caractérisation des biopolymères utilisés : effets de l'extraction

4.1.1. Les globulines de pois

4.1.1.1. Matière première et méthode d'extraction retenues

- **Préparation**

Le protocole retenu a été une précipitation acide des globulines à partir de la fraction soluble à pH alcalin de l'isolat commercial. Auparavant, des méthodes d'extraction ont été expérimentées en partant de graines de pois sec. L'impact de la méthode a été évalué sur la qualité finale (= faible dénaturation) de l'isolat de laboratoire préparé. Ceci a animé le premier volet de nos recherches (Mession et al., 2012_{a,b}). Ces deux travaux figurent à la fin de ce présent document dans les parties **P1** et **P2 (les publications ont été jointes dans la partie Publications du présent document).**

Par rapport à des études précédentes sur les protéines de pois, **une délipidation extensive par solvants (pentane et éthanol) a été opérée** sur les poudres sèches, de manière similaire à ce qui se fait pour des farines de soja généralement plus « grasses » que celles de pois ; le contenu en lipides totaux pour ces dernières est de l'ordre de 0,5-2% (Guéguen, 1983, Tömösözi, Lasztity, Haraszi, & Baticz, 2001).

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

Il est à noter qu'une extraction des protéines entraîne avec celles-ci des lipides qui s'enrichissent dans l'isolat obtenu et le contaminent (Fuhrmeister et al., 2003 ; Shand et al., 2007). Nous avons également procédé à une séparation des globulines légumine 11S et viciline/convicine 7S pour l'obtention de fractions très enrichies (>80% pour les fractions viciline et légumine) (Mession et al., 2012_b). Elles nous ont permis de mettre en évidence la contribution de chaque globuline (i) à quelques propriétés physicochimiques du mélange de protéines et (ii) au comportement de phase de mélanges globulines (quasi-) natives - alginate (voir **partie 4.2**).

Les principaux constituants des sources de protéines de pois étudiées (graines de pois ou isolat commercial) sont présentés dans le **Tableau 4.1**.

Table 4.1

Compositions^a chimiques des graines de pois et de l'isolat commercial fournis, issus du même batch d'après les informations du fournisseur Roquette.

Matière première	Lipides extractibles %	Azote total %	Protéines % (K=6,25)	Cendres %
Graines de pois (farine)	1,3	4,3	23,4	2,2
Isolat S85M	5,0	12,8	80,0	4,8

^a Les valeurs sont des moyennes de deux répétitions, données en % (m/m, sur une base matière sèche).

L'isolat commercial contenait davantage de lipides que les graines, du fait qu'une précipitation acide sans délipidation au préalable tendait à concentrer les lipides dans l'isolat de protéines (Fuhrmeister et al., 2003 ; Shand et al., 2007). Une teneur en cendre plus élevée est attribuée aux sels ajoutés par HCl et NaOH utilisés lors de la préparation (**Figure 1.4**). En dépit d'une teneur en protéines plus élevée de l'isolat, la fraction d'azote soluble à pH 8 était de $90,06 \pm 2,86$ % et $45,79 \pm 1,21$ % NSI pour la farine et l'isolat, respectivement, et sans différences significatives si une délipidation avait été opérée sur les poudres brutes. Clairement, l'isolat commercial présentait intrinsèquement une solubilité des protéines à pH alcalin assez médiocre, en revanche meilleure par rapport à d'autres isolats (de l'ordre de 20-25% à pH 8) (Fuhrmeister et al., 2003 ; Shand et al., 2007).

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

Question rendement, on peut résumer ainsi, à partir de 20 g matière première de départ :

Farine de pois délipidée (i) : 4,2 g protéines solubilisés à pH 8, rendement de récupération des globulines à la précipitation (pH 4,8, valeur moyenne proche des points isoélectriques ($\approx 4-5$) de l'ensemble des globulines végétales) de l'ordre de 20-26%. Près de 1g de protéines dans l'isolat sont obtenus au final. Alternativement, le rendement final par ultrafiltration-diafiltration était légèrement inférieur à 40%, pour un recouvrement de protéines d'environ 1,4g. Des composés azotés (peptides, acides nucléiques...) ou petites protéines type albumines sont éliminées (Mession et al., 2012_b – **P2**). Si l'extraction est poussée jusqu'au fractionnement, sont récupérés autour de 270 mg pour chaque fraction enrichie.

Isolat délipidé (ii) : le recouvrement de protéines à partir de la fraction soluble à pH 8 est compris entre 75 - 83%, soit $\approx 7 - 8$ g au final.

- **Composition chimique des isolats de laboratoire**

Les isolats (poudres) PPP (Mession et al., 2012_b - **P2**) et PPI (Mession et al., 2012_a, voir **P1**) avaient un contenu en protéines et en cendres de 85,5%, 6,7 et 92,5%, 7,4% (m/m, base MS), respectivement. Des contenus élevés en cendres sont attribués à la méthode d'extraction par acidification, qui nécessite en retour par la suite des ajouts de soude diluée pour ressolubiliser au-dessus de pH 7 les globulines précédemment insolubilisées. Il a été détecté des contenus en lipides résiduels extractibles inférieurs à 1% (m/m) dans les isolats. Il est à noter que près de 8% (m/m) des constituants de PPP sont de composition non déterminée, fort probablement des fibres ou oligosaccharides résiduels (Fuhrmeister et al., 2003 ; Shand et al., 2007). L'isolat PPI ne présentait pas de composés non protéiques autres que des sels.

4.1.1.2. Caractérisation des isolats de globulines

- **SDS-PAGE (i)**

La **Figure 4.1a** met en exergue les compositions en polypeptides des deux isolats PPP et PPI, comparé aux fractions enrichies en légumine (Leg) et Viciline (Vic) obtenus dans **P2** :

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

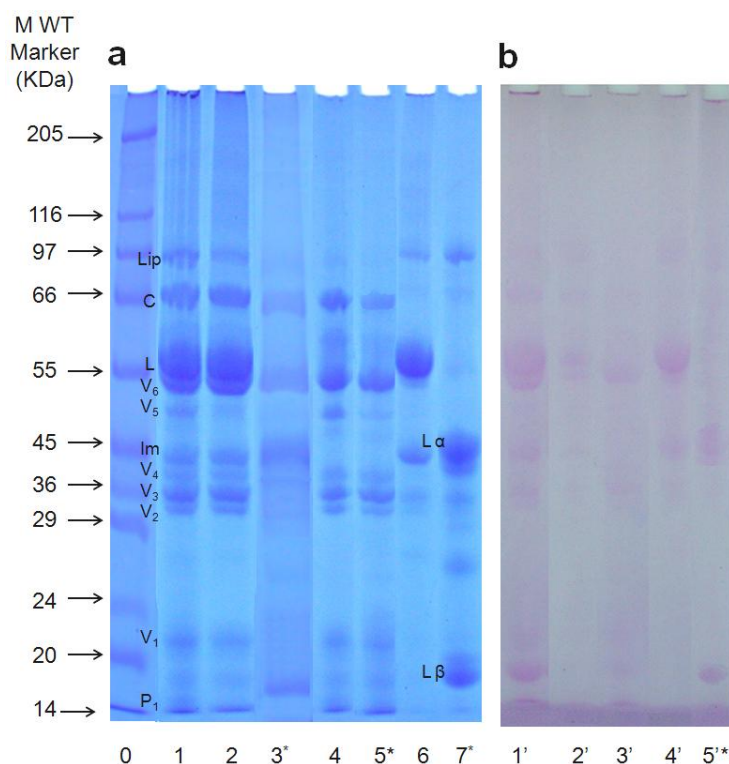


Figure 4.1 : Electrophorèse (10% acrylamide, gel continu) dénaturantes (0.1% SDS (m/v)) des isolats de globulines de pois. Les puits marqués d'un astérisque sont les profils électrophorétiques en présence de SDS et de DTT (10%, m/v). Dans chaque puits a été déposé 100 µg de protéines. Puits 0 : marqueurs de poids moléculaire ; 1, 1' et 2, 3* et 2' : isolats préparés par précipitation acide (pH 4.8) à partir de farine de pois (PPP) et de l'isolat commercial S85M (PPN), respectivement ; 4, 5* et 4' : fraction viciline (Vic) 7S ; 6, 7 et 5'* : fraction légumine (Leg). P₁ : polypeptide PA₁ ou fragments de viciline ; V₁₋₆ : polypeptides de viciline, L : sous-unité de légumine et polypeptides acide et basique L_α et L_β, respectivement, C : conviciline et Lip : lipoxygénase. Le gel (a) a été révélé au bleu de Coomassie, le gel (b) par la méthode acide périodique-base de Schiff (glycoprotéines).

Ce qui est frappant au premier abord est le grand nombre de polypeptides constitutifs des globulines de pois. Les polypeptides ont été identifiés d'après les travaux de Guéguen et al. (1984), Gatehouse et al. (1980, 1982), et Shand et al. (2007). Pas moins de 5 polypeptides V₁₋₅ appartenant à la viciline ont été dénombrés, s'échelonnant de moins de 20 kDa, entre ≈30 et ≈40 kDa, 48 kDa et 52 kDa. Cette dernière masse moléculaire correspond à la sous-unité majoritaire V₅ de viciline et les sous-produits de protéolyse *in vivo* de cette même sous-unité, à l'origine de l'hétérogénéité des vicilines. La bande diffuse à 55 kDa est assimilée à la sous-unité majoritaire de légumine L. En présence de DTT, la réduction des ponts disulfure libère les deux polypeptides L_α (38-40 kDa) et L_β (18-20 kDa). Deux polypeptides supplémentaires ont été détectés : il s'agit de la conviciline à ≈66 kDa et la lipoxygénase à 89 kDa. Les polypeptides P₁ qui migrent à la ligne de front (<20 kDa) devraient être des fragments de la

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

viciline α (20 kDa), β (13 kDa), γ (12-16 kDa) (Tzitzikas et al., 2006) ou à des résidus d'albumine PA_1 . L'albumine PA_2 (P_2) peut apparaître comme une bande faible à ≈ 24 kDa. Un polypeptide à ≈ 40 kDa a été considéré comme une impureté que l'on retrouve d'ailleurs dans la fraction séparée de légumine. Il pourrait s'agir de polypeptides L_α associés en trimères mais non encore lié *in vivo* de manière covalente via des ponts disulfures avec L_β (Tzitzikas et al., 2006).

Il a été mis en évidence une bande qui ne migrerait pas et restait au fond du puits de dépôt ; il peut s'agir d'agrégats protéiques (>200 kDa) formés au cours de l'extraction. Celle-ci disparaît en présence de DTT. Par densitométrie, l'agrégat évoqué ci-dessus représentait de 1 à 2% du total des polypeptides. Il est à noter en outre que la composition en polypeptides de l'isolat PPI était très similaire à celle de PPP. Conformément aux dires de l'industriel, il s'agissait donc bien du même lot.

La présence éventuelle de glycoprotéines dans les isolats a été investiguée (donnée non montrée concernant PPI). Des polypeptides à <14 , 20, 52, 55 et 65 kDa apparaissent majoritairement, et à 30, 40 kDa plus faiblement. L'intensité globale des bandes était plus prononcée pour PPP que PPI, reflétant probablement une meilleure élimination des glycoprotéines dans le deuxième cas. Deux précipitations acides à pH 4,8 (dont la première a été effectuée en industrie comme il l'a été précisé par le fournisseur) pour l'extraction des globulines semblait être un choix adéquat afin de réduire les interactions entre celles-ci et des contaminants type petits osides complexés, solubilisés en même temps que les protéines à pH 8 lors de la préparation des isolats (Guéguen, 1983 ; Tömösközi et al., 2001) Le fragment γ (12-16 kDa) de la viciline peut être glycosylé (Tzitzikas et al., 2006), alors que ce phénomène semble plus rare pour la légumine (Gatehouse et al., 1980, Boye et al., 2010).

- **Solubilité en fonction du pH (ii)**

Les profils de solubilité de l'azote selon le pH, à faible force ionique, pour de suspensions initialement à 0.5% (m/m) de protéines d'isolat ont été établis (**Figure 4.2**). Les profils obtenus pour les isolats PPN et PPn sont très similaires, caractéristiques de globulines végétales en mélange et en apparence faiblement dénaturées (Fuhrmeister et al., 2003 ; Kimura et al., 2008 ; Shand et al., 2007). Néanmoins la solubilité de l'isolat S85M brut dans les mêmes conditions présentait un profil aplati typique de protéines isolées industriellement,

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

par précipitation acide et ressolubilisation alcaline en présence d'acide et de base concentrés (≥ 1 M) et séchés par atomisation.

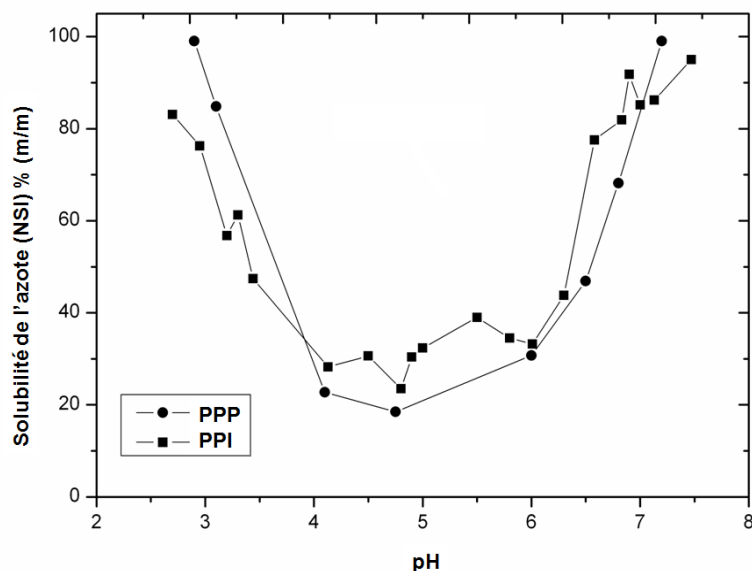


Figure 4.2 : Solubilité de l'azote (NSI) en fonction du pH et en absence de sels pour des suspensions à 0,5 % (m/m) initialement d'isolats de globulines de pois préparés par précipitation acide, à partir de farine de pois (PPP) ou d'isolat commercial (PPI) préalablement délipidés.

Le minimum de solubilité de l'azote est de l'ordre de $\approx 18 - 20\%$ NSI, pour un domaine de pH relativement large qui s'étend de 4 à 6. Il y a neutralisation des charges par une moindre ionisation des fonctions acide carboxylique, en combinaison avec davantage de charges positives portées par les groupements ammonium des protéines. Cette solubilité augmente abruptement entre des pH de 4 à 3 et 6 à 7 pour atteindre pratiquement 100% dans les deux cas ; à des pH acides inférieurs à $\approx 2,8$, la rupture de la structure quaternaire des sous-unités des globulines a été rapportée, notamment de la légumine (Subirade et al., 1992). A partir de pH supérieurs à 6, la solubilité est meilleure du fait de l'augmentation de la charge nette globale négative par ionisation des groupements carboxylate.

La solubilité des fractions enrichies Leg et Vic montre un resserrement du domaine de pH au minimum de solubilité (20-25%) autour de valeurs de points isoélectriques mieux définis de $\approx 5,5$ et $\approx 5,9$ (voir **Figure 2b**, sous-partie 3.1.6 de P2). La ré-augmentation de la solubilité pour des pH acides est plus progressive que précédemment car elle s'étale de $\approx 5,5$ à ≈ 3 . Clairement, la neutralisation des charges de surface est plus ponctuelle avec des globulines séparées, sachant d'autant plus que la précipitation dans le cas de globulines non

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

séparées peut faire intervenir des complexes insolubles entre légumine et viciline. Une plus grande hétérogénéité de densité de charge, donc moins prévisible selon le pH dans le cas de globulines non séparées, est évidente.

Une valeur relativement haute (20% NSI) de solubilité au minimum pour PPP, PPI et Vic peut être attribuée aux parties osidiques, chargés ou non, attachés aux globulines et modifiant leur solubilité (Pedrosa et al., 1997). Ce contenu peut représenter entre 2 et 6% en masse des globulines 7S (Davey et al., 1979, Derbshyre et al., 1976).

A noter que la solubilisation dans l'eau déionisée des isolats PPN et PPP pour la préparation des solutions mères est apparemment totale au pH naturel ($7,2\pm 0,1$), puisque la centrifugation opérée à titre préventif ne mettait pas en évidence de particules insolubles.

Ces constatations tendaient à prouver qu'une précipitation acide appliquée à la fraction soluble d'un isolat, pourtant de qualité moyenne au départ, permet de concilier faible dénaturation et moindres contaminations.

- **Propriétés thermiques (iii)**

Les paramètres T_{onset} , (i), T_d (ii) et ΔH_d (iii) ont été discutés dans la Table 2 de la sous-partie 3.1.7 de l'Annexe 8 pour PPP. Concernant PPI préparé de la même manière à 10% (m/m) de protéines dans 0,1 M NaCl, pH 7,2, les valeurs mesurées sont (i) : $77,2\pm 0,2^\circ\text{C}$, (ii) : $87,5\pm 0,7$ et (iii) $13,9\pm 0,37 \text{ J/g}_{\text{protéine}}$.

Une seule transition endothermique a été notée pour une valeur de T_d de $\approx 87,5^\circ\text{C}$ dans les deux cas, correspondant à la dénaturation simultanée dans le même domaine de températures des fractions viciline et légumine. Il a d'ailleurs été montré que les valeurs de T_d pour les fractions séparées étaient de $\approx 89^\circ\text{C}$ (voir **partie 3.1.7** dans **P2**). Dans chaque cas, la dénaturation est irréversible, du fait de l'absence d'une transition lors d'un réchauffage de l'échantillon. Une température élevée supérieure à 80°C a été rapportée pour la plupart des globulines de dicotylédones, du fait de leur structure particulièrement compacte difficile à déplier (Marcone et al., 1998_c). Un pic endothermique majeur reflète une dénaturation coopérative, du fait que les différents niveaux de structure et les domaines conformationnels sont maintenus par des forces interdépendantes, en particulier chez les légumine. A rappeler que la structure tertiaire de chacun des six monomère est maintenue par des ponts disulfures entre L_α et L_β (Casey, 1979 ; Tzitzikas et al., 2006).

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

En dépit de la présence de sel dans le cas présent, ces températures sont dans le même ordre de grandeur que celles mesurées par Sun et al. (2010) et Shand et al. (2007). La réserve que la composition en globulines dans le mélange affecte les paramètres thermiques est également à émettre.

Les valeurs d'enthalpie de dénaturation pour PPP et PPI sont plus élevées et dans le même ordre de grandeur que celles obtenues par Shand et al. (2007) et Sun et al. (2010), respectivement. Il apparaît que l'extraction de PPI a été plus douce que pour PPP, qui a nécessité pour ce dernier un long broyage mécanique au mortier. Les solutions de HCl et NaOH pour la préparation des isolats étaient deux à dix fois plus diluées (0,25-0,5 M) que celles utilisées par Shand et al. (2007) et l'ajout progressif afin d'éviter des variations brutales de pH au voisinage des protéines en suspension.

Le choix de l'isolat S85M semble ainsi conforté, et cela malgré les qualités médiocres souvent rapportées pour ceux-ci lorsque cette matière première est utilisée telle quelle. Effectivement, il n'était pas satisfaisant d'utiliser l'isolat industriel brut, mais une fois retravaillé comme indiqué, les globulines restantes sembleraient faiblement dénaturées ou (quasi-) natives.

4.1.2. Caractérisation de l'alginate purifié

4.1.2.1. Composition chimique des alginates commercial et purifié

Le **Tableau 4.2** donne la composition chimique entre la poudre Alg préparée à partir d'alginate brute fourni par Sigma-Aldrich. La purification permet d'éliminer tous les matériaux non complexés par le calcium ajouté. Des composés azotés sous forme de traces et des fibres solubles type glucanes (polyosides neutres de monomères de glucose) ont été éliminés par le procédé de purification (Panikkar et al., 1996). Outre l'élimination des complexes Ca-EDTA formés lors de la ressolubilisation de l'alginate gélifié, l'étape de dialyse permettait de standardiser la composition en sels et d'éliminer des pigments. On constate que la teneur en calcium est du même ordre avant et après purification.

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

Tableau 4.2

Compositions^a de l'alginate brut et purifié.

Produit	Composés azotés %	Fibres solubles% ^b	Cendres % (Na ; Ca, mg/g poudre)
Alginate commercial	0,02	2,2	15,2 (ND ; 2,9)
Alginate purifié (Alg-Na)	<0,01	<0,1	18,9 (111,5 ; 3,4)

^a Les valeurs sont des moyennes de deux répétitions. Les teneurs sont données en % (m/m sur une base masse sèche).^b déterminé d'après Nielsen (2003).

4.1.2.2. Viscosité intrinsèque [η]

La masse moléculaire mais aussi la taille et la conformation de chaîne d'une macromolécule vont conditionner sa viscosité intrinsèque (Lai et al., 2002). A 20°C et dans 0,1 M NaCl, les valeurs de la viscosité intrinsèque [η] ont été calculées à partir de (Eq. 3.3-4, **partie 2.2.1.2**) concernant l'alginate commercial et purifié. Celles-ci sont de 586±28 et 497±37 mL/g, respectivement. Ces valeurs correspondent à des alginates intermédiaires en termes de taille et de masse moléculaire (\approx 150 kDa) (Stokke et al., 2000). Il n'est pas exclu que le procédé de purification ait quelque peu modifié la conformation des chaînes et leur affinité vis-à-vis des sels en solution. La réduction de l'ordre de 15% de [η] pour Alg-Na serait attribuée à des modifications de l'environnement ionique des chaînes d'alginate, d'autant plus marqué dans le régime dilué pour des polyélectrolytes (Lai et al., 2002).

Des cations divalents (calcium) ont un effet plus marqué à la même concentration que des cations monovalents (sodium) par leur capacité à complexer les chaînes chargées négativement. Notamment l'augmentation de la teneur en calcium et une teneur plus élevée en sels dans l'échantillon purifié Alg-Na peut être à l'origine d'associations intra-chaînes d'alginate (en régime très dilué) et, du moins de moindres répulsions électrostatiques entre elles qui tendent à les rapprocher. La contraction des chaînes peut expliquer une diminution de leur viscosité réduite en diminuant infiniment la concentration C. Probablement la présence de contre-ions apportés par l'alginate auraient tendance à dilution élevée de rétracter les chaînes (Lai et al., 2002). Afin de s'affranchir de l'effet de ces contre-ions, une concentration en NaCl de 0,1 M est bien souvent employée (Stokke et al., 2000).

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

En raison de la nature de polyélectrolyte de l'alginate, le paramètre B de flexibilité de chaîne a été évalué (**Figure 4.3**). En régime dilué, il est mis en évidence une diminution de $[\eta]$ en augmentant la force ionique. Ce phénomène est attribué d'une part (i) à un plus grand écrantage des répulsions électrostatiques intra-chaînes chargées négativement, et d'autre part (ii) à la moindre influence des contre-ions apportés par l'alginate, comme par exemple une moindre affinité des chaînes pour le calcium résiduel en augmentant la concentration en sodium (Neiser et al., 1999 ; Haug et al., 1965_a). Le paramètre S calculé d'après (**Eq. 1.4**) (Smidsrød et al., 1971). La valeur de $[\eta]_{I=100}$ est difficilement interprétable en pratique, du fait qu'une concentration en NaCl supérieure à 1 M entraînerait une insolubilisation de l'alginate (Clare, 1993).

Une plus grande flexibilité de chaîne est reflétée par une plus grande dépendance de $[\eta]$ à la concentration en NaCl (Lai et al., 2002). La force ionique conditionne l'expansion ou la contraction des chaînes de polyélectrolytes. Le paramètre empirique B de Smidsrød-Haug a été défini et s'avère plus informatif que S, qui dépend de la masse moléculaire. La valeur de B calculée pour Alg-Na est de 0,034, au-dessus de la valeur de 0,03 communément rapportée pour des alginates semi-flexibles (Dentini, Rinaldi, Risica, Barbetta & Skjak-Braek, 2005). Cette flexibilité est plus importante ($B > 0,032$) pour des alginates riches en séquences MG. Il apparaît ainsi que le calcium résiduel a bien été éliminé lors de la purification, et que l'alginate considéré est plutôt flexible. Il ne posséderait probablement pas de longues séquences homopolymériques G responsables de la raideur des chaînes d'alginate.

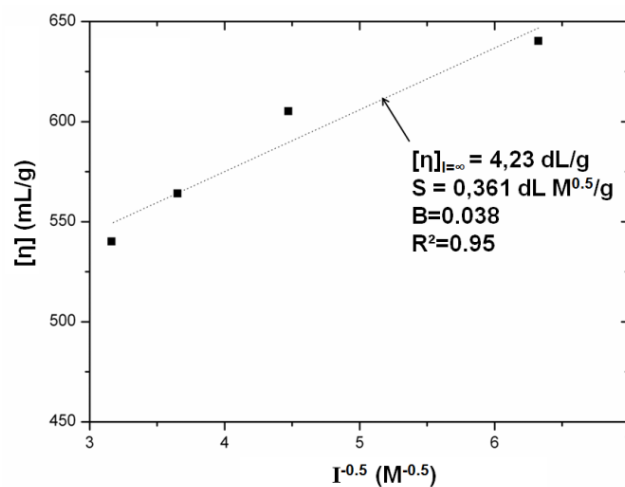


Figure 4.3 : Viscosité intrinsèque de l'alginate purifié Alg-Na en fonction de l'inverse de racine carrée de la force ionique I, à 20°C.

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

4.1.2.3. Concentration critique de chevauchement des chaînes

En régime dilué, les chaînes sont isolées et ont une entropie conformationnelle liée aux seuls mouvements browniens (Lai et al., 2002). En augmentant leur concentration, les collisions sont plus fréquentes et le volume hydrodynamique total occupé par les chaînes serait supérieur au volume de la solution. Il existe donc une concentration à partir de laquelle les chaînes se chevauchent, à l'origine d'un gain de viscosité de la solution non-linéaire par rapport à la concentration en polymère. De ce fait, une troisième donnée concerne le passage d'un régime dilué à semi-dilué pour un polymère donné ; ceci est conditionné par le volume hydrodynamique des chaînes, lié à leur masse moléculaire moyenne, leur rigidité et les interactions polyélectrolyte-solvant (Dentini et al., 2005). La dépendance de la viscosité spécifique η_{sp} envers la concentration C en alginate et en l'absence de cisaillement est mise en évidence à la **Figure 4.4**. La concentration critique C^* de chevauchement de l'alginate purifié Alg-Na a été estimée à 20°C et en l'absence de sels.

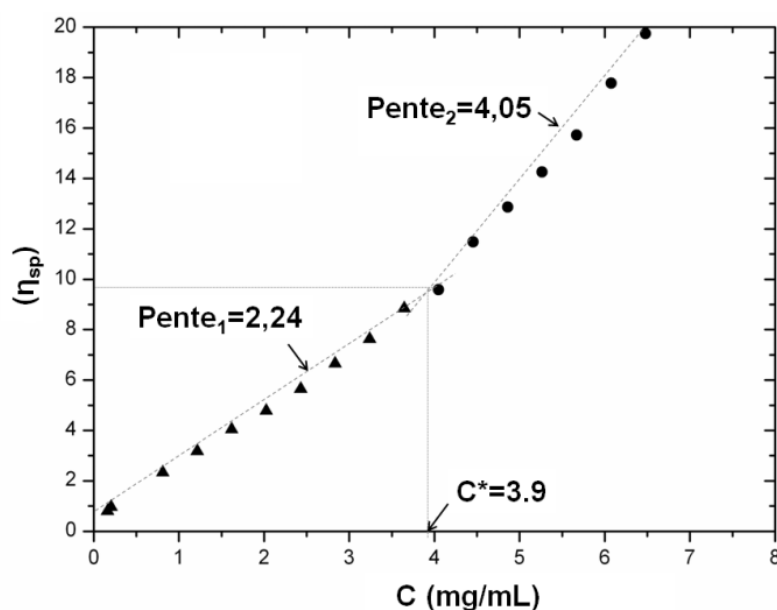


Figure 4.4 : Variation de la viscosité spécifique η_{sp} en fonction de la concentration en alginate purifié et de sa viscosité intrinsèque $[\eta]$, à 20°C et en l'absence de sels. Les valeurs ont été déterminées par viscosimétrie capillaire. La concentration C^* est déterminée au point de rupture de pente du profil de viscosité.

La valeur de C^* a été déterminée à 3,9 mg/mL. Dans l'eau déionisée, les chaînes d'alginate présentent un maximum de répulsions et seuls les contre-ions apportés par l'alginate peuvent éventuellement interférer. Le calcium résiduel peut être à l'origine

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

d'associations inter-chaînes pour de plus hautes valeurs de C , d'où une augmentation de la viscosité plus marquée à partir de C^* .

Des valeurs faibles sont obtenues pour des alginates particulièrement étendus et rigides, notamment enrichis en blocs homopolymériques G. A l'inverse, des chaînes d'alginate riches en blocs homopolymériques M ou hétéropolymériques MG seraient davantage flexibles, à conformation spatiale plus aléatoire que dans le cas précédent. Ceci met en évidence pour ces derniers alginates une concentration C^* de début de chevauchement des chaînes plus élevée que pour des chaînes plus rigides et donc de conformation plus étendue en solution (Dentini et al., 2005). Un point de comparaison avec d'autres alginates serait possible, connaissant leur masse moléculaire. L'effet de la séquence sur la flexibilité pourrait être déterminé sur des alginates de masses moléculaires proches.

D'après l'article Mession et al. (2012_a – P1), des solutions d'alginate purifié entre 0,4 et 0,95 % (m/m) dans 0,1 M NaCl et pH 7,2 montraient un comportement newtonien à l'écoulement ($0,8^{-3} \cdot 10^{-2}$ Pa.s). A 1,2 %, le comportement devenait légèrement rhéofluidifiant.

Une fois les biopolymères caractérisés et les effets de l'extraction/purification pris en compte sur leurs propriétés physico-chimiques, le comportement de phase considérons d'un système aqueux protéines de pois-alginate a été étudié.

4.2. Un système aqueux incompatible globulines de pois « natives » - alginate de sodium

Comme un tel système n'avait pas été décrit auparavant, il s'imposait à nous de caractériser des mélanges à différentes compositions initiales en globulines de pois et alginate dans des conditions où les deux biopolymères sont chargés négativement (pH 7,2, supérieur de 2 unités au minimum de solubilité de PPP (PPn) et PPI (PPN)) et avec une concentration modérée en sels (0,1 M NaCl) afin d'écranter partiellement les charges entre protéines et de favoriser des interactions attractives entre elles. L'effet de volume exclu entre biopolymères

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

non-similaires mis en présence primerait alors sur des effets de charge (Grinberg et al., 1997 ; Semenova et al., 1998). Ici sera comparé le comportement de phase des systèmes PPN-Alg-Na) et PPN-Alg. Il sera fait allusion brièvement à un système aqueux plus simple Leg-Alg, Leg étant la fraction très enrichie en légumine obtenue comme il l'a été décrit dans une de nos études (Mession et al., 2012_b – P2).

Dans les **parties 4.2.1-2, précisons bien que PPN est la solution de globulines natives préparées à partir de PPI et PPN à partir de PPP**. Les solutions mères ont été préparées chacune à 16% (m/m) en protéines. La solution Alg₀ avait une concentration réelle en alginate (sans les sels) de 3,2% (m/m) en règle générale.

4.2.1. Diagramme de phase

Le déphasage des mélanges correspondant aux systèmes évoqués ci-dessus a été suivi d'abord macroscopiquement. Une fois l'agitation stoppée et les tubes mis au repos à 20°C, la plupart des mélanges montraient apparemment deux phases de densité différente. Une centrifugation douce mais longue permettait de mettre en évidence une séparation nette entre une phase du haut claire et une phase du bas orangée translucide, généralement plus compacte que celle du haut. Les dosages dans chacune des phases (ou les déterminations par différence dans les phases du bas, le plus souvent) montraient par rapport aux concentrations de départ un enrichissement en alginate et un appauvrissement en protéines, et inversement dans la phase du bas. Un diagramme de phase pour chaque mélange a été établi (**Figure 4.5**).

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

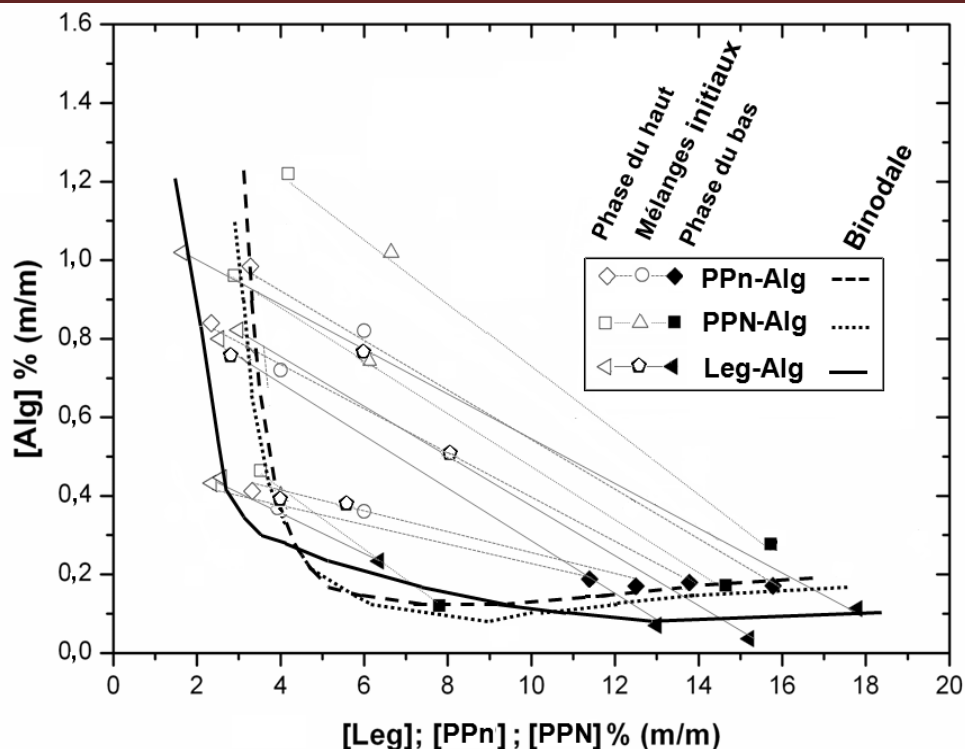


Figure 4.5 : Superposition de trois diagrammes de phases à 20°C correspondant chacun à un système contenant des globulines de pois préparés à partir de l'isolat PPP (PPn) soit (ii) PPI (PPN), soit (iii) de fraction de légumine 11S (Leg) enrichie à $\approx 80\%$, en mélange avec de l'alginate de sodium Alg-Na. Les paramètres de solvant sont pH 7,2 et 0,1 M NaCl.

Les binodales obtenues pour les systèmes contenant PPn ou PPN sont pratiquement confondues, alors que cette limite de co-solubilité apparaît plus déplacée vers les axes de concentration dans le cas de la fraction Leg qui a été utilisée.

Cela signifie un domaine d'incompatibilité visiblement plus étendu dans le cas de la légumine de plus haute masse moléculaire moyenne (330 - 410 kDa), que si celle-ci se trouvait plus diluée avec des protéines plus petites, c'est-à-dire les vicilines/conviciline (150 - 180 kDa) (Croy et al., 1980 ; Tzitzikas et al., 2006). La concentration en protéines dans les mélanges incompatibles Leg - Alg dans les phases du haut fluctuait entre ≈ 2 et $\approx 2,5\%$ (m/m), alors que celle-ci pour les mélanges PPn ou PPN - Alg était entre ≈ 3 et 4% . Dans le même ordre d'évocation, la concentration en Alg dans la phase du bas était de l'ordre de $\approx 0,1-0,2\%$ et $\approx 0,1-0,3\%$, voire plus pour des mélanges PPn/PPN - Alg concentrés initialement en polysaccharide ($>1\%$), qui ont été exclus pour l'établissement du diagramme ; leur droite de conjugaison pouvait en couper d'autres, ce qui est un signe d'un état de minimum d'énergie dans le mélange non-atteint (voir ci-après).

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

Il est à noter que la binodale était mieux résolue dans le cas de la légumine que dans les deux cas de globulines non-séparées PPN et PPn en mélange avec l'alginate. En d'autres termes, la distinction entre mélanges co-solubles et immiscibles était nette pour le système légumine-alginate, donnant lieu à une limite de co-solubilité moins diffuse que celle obtenue avec les globulines non-séparées. Pour se le figurer, les phases coexistantes après séparation de phase de mélanges concentrés montraient des compositions en biopolymères (et donc des extrémités des droites de conjugaison) qui atteignaient davantage la binodale préétablie pour d'autres mélanges moins concentrés. **Le système incompatible avec la légumine atteindrait donc plus facilement un état d'équilibre thermodynamique, par rapport aux systèmes avec les globulines non-séparées.** En effet et pour ce qui est des mélanges avec PPN ou PPn, il a été observé :

- (i) Des mélanges à 2% (m/m) de globulines initialement et pour des concentrations en alginate supérieures à 0,4% (0,8-1,2%) montraient après centrifugation un culot qui ne pouvait être attribué à une phase du bas typique ; les dosages n'indiquaient ni enrichissement en Alg ni diminution de la concentration en globulines significative (<10% de variation par rapport aux concentrations de départ). En dépit d'une séparation de phase amorcée à une concentration initiale en protéines plus faible par une augmentation la concentration en polysaccharide, les effets ségrégatifs dans ces mélanges à la limite de co-solubilité sont visiblement trop faibles pour mener à un véritable déphasage macroscopique.
- (ii) L'état de non-équilibre après séparation de phase pour des mélanges concentrés a été observé (composition de départ supérieure à 6-8% (m/m) en protéines et 1% en alginate). Cela a été attribué d'une part à des effets de viscosité renforcés notamment lors de l'enrichissement de l'alginate dans ce qui deviendra la phase du haut. Des microdomaines protéiques resteraient piégés et ne sédimenteraient pas, surestimant la concentration en protéines dans la phase du haut (mélanges non considérés en conséquence). Une plus haute vitesse de centrifugation (4000g pendant 4x30 min) ne permettait pas une meilleure séparation ; les phases coexistantes présentaient les mêmes volumes relatifs que précédemment (2500g). Il a été essayé une centrifugation jusqu'à 10000g mais en conséquence, la phase du bas apparaissait gélifiée (ne coule pas), du fait de sa compaction trop importante.

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »–alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

Il est à signaler que des mélanges de viciline 7S séparée avec l'alginate ne montraient pas de séparation de phase macroscopique, plutôt un sédiment comme cela était le cas pour des mélanges à 2% de protéines cités ci-dessus (Mession et al., 2012_b). Il n'y aurait pas d'effets ségrégatifs significatifs entre les vicilines et les chaînes d'alginate dont l'entropie conformationnelle est peu ou pas entravée, du fait d'effets de volumes exclus trop faibles (De Kruif et al., 2001). En considérant maintenant la limite de co-solubilité pour le système aqueux légumine enrichie-alginate, **il semblerait donc que ce soit la présence de légumine 11S dans le mélange de globulines qui provoque la séparation de phase**. Une autre hypothèse était la présence de convicine hautement chargée à pH 7.2, réduisant les interactions protéines-protéine (O'Kane et al., 2004_a). Il serait à expérimenter une concentration plus élevée en NaCl afin de davantage masquer l'excès de répulsions électrostatiques (Semenova et al., 1998).

Des considérations macroscopiques de la séparation de phase sont insuffisantes. Les études de microstructure par MCBL peuvent aider à mettre en évidence les morphologies de microdomaines enrichis en biopolymères.

4.2.2. Données de microstructure au MCBL

4.2.2.1. Aspects morphologiques

Les études de microstructure permettent de déceler une éventuelle séparation de phase, qui se produit microscopiquement en premier lieu. Si les différences de densité entre les deux phases enrichies chacune en un biopolymère sont suffisamment marquées, la séparation de phase est visible macroscopiquement (Schorsch, Jones, & Norton, 1999). Ainsi l'étude des trois systèmes évoqués ci-dessus s'est poursuivie par une analyse au MCBL. Plusieurs mélanges ont été analysés (**Figure 4.5**). Deux évolutions croisées sont à considérer : soit (i) une évolution spatiale en faisant varier la composition initiale en biopolymères, soit (ii) une évolution temporelle au cours de laquelle la maturation des phases coexistantes est observée.

Les protéines marquées fluorescent uniformément. Par ajout d'alginate, les mélanges mettent en évidence des zones fluorescentes correspondant aux microdomaines enrichis en protéines marquées par la RITC, et dispersés dans une phase continue sombre contenant

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

l'alginate. Un double marquage a été effectué pour permettre cette identification sans ambiguïté (Mession et al., 2012_a). Dans tous les mélanges étudiés, la coexistence de deux phases immiscibles enrichies chacune en l'un des deux biopolymères est significative d'inhomogénéités dues à un déphasage microscopique, après cessation de l'agitation puis dépôt sur lame et début des observations (≈ 1 min concernant ces deux dernières étapes).

Afin de se figurer l'effet de la composition initiale sur la fraction volumique des deux phases coexistantes, plusieurs mélanges dont trois D, E et F respectivement à $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ et $\frac{3}{4}$ d'une même droite de conjugaison sur le diagramme de phase PPN-Alg ont été préparés individuellement. Deux autres mélanges G et H respectivement proche du domaine de co-solubilité et profondément dans le domaine incompatible ont été choisis. De manière similaire, une droite de conjugaison et trois mélanges A, B, C ont été choisis sur le diagramme de phase PPN-Alg à titre comparatif. La **Figure 4.6** donne un aperçu des microstructures généralement observées.

→ N. B. D'après ce qui a été mentionné dans les articles Mession et al., 2012_{a,b} – **P1** & **P2**, Nous pourrions émettre l'hypothèse que certaines interactions non-contrôlées, voire non prévisibles du fait de la grande complexité des globulines non-séparées, empêcheraient que les mélanges atteignent l'équilibre thermodynamique. D'une part, (i) le fait que des mélanges dilués (type PPN – Alg 2-0,4 ; 0,8 ; 1.2) montraient une précipitation (ou insolubilisation des protéines, impliquant 5 à 10% de la quantité initiale de protéines introduites) qui ne pouvait être attribuée à une véritable phase enrichie en protéines, et d'autre part (ii) l'aspect agrégé de la phase protéique laisseraient penser que la phase protéique ne soit pas strictement liquide. Eventuellement l'agrégation protéique en présence d'alginate, observée même dans le cas de mélanges miscibles par rapport à leur position entre les axes de concentration et la binodale (**Figure 4.5**) pourrait être due à des interactions attractives localement entre chaînes d'alginate et points chargés positivement ça et là à la surface des globulines. Il peut être suggéré que ces interactions menaient à la formation de complexes insolubles en très faibles quantités et qui précipitaient. Il est à noter que ce phénomène n'a pas été observé dans le cas de mélanges Leg – Alg. Par microscopie, les microdomaines protéiques étaient sphériques et typiques et typiques d'une séparation de phase liquide-liquide. En revanche, les mélanges viciline - Alg montraient un phénomène de précipitation partielle (mais faible) des protéines, comme cela était le cas pour les globulines non-séparées extraites de l'isolat industriel ou des graines de pois. Il y a donc là matière à penser que

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

l'hétérogénéité de taille et surtout de charge des polypeptides constitutifs de la fraction viciline perturberaient la séparation de phase ségrégative dans les cas PPn – Alg ou PPN – Alg. Le mode d'extraction des globulines pourrait aussi modifier le comportement de phase (cf dans Mession et al., 2012_b – **P2**, le cas des globulines extraites par UF/DF : pas les mêmes microstructures que celles obtenues avec PPn !). Au sens strict du terme, il serait donc préférable de parler de diagrammes d'état que de diagrammes de phase.

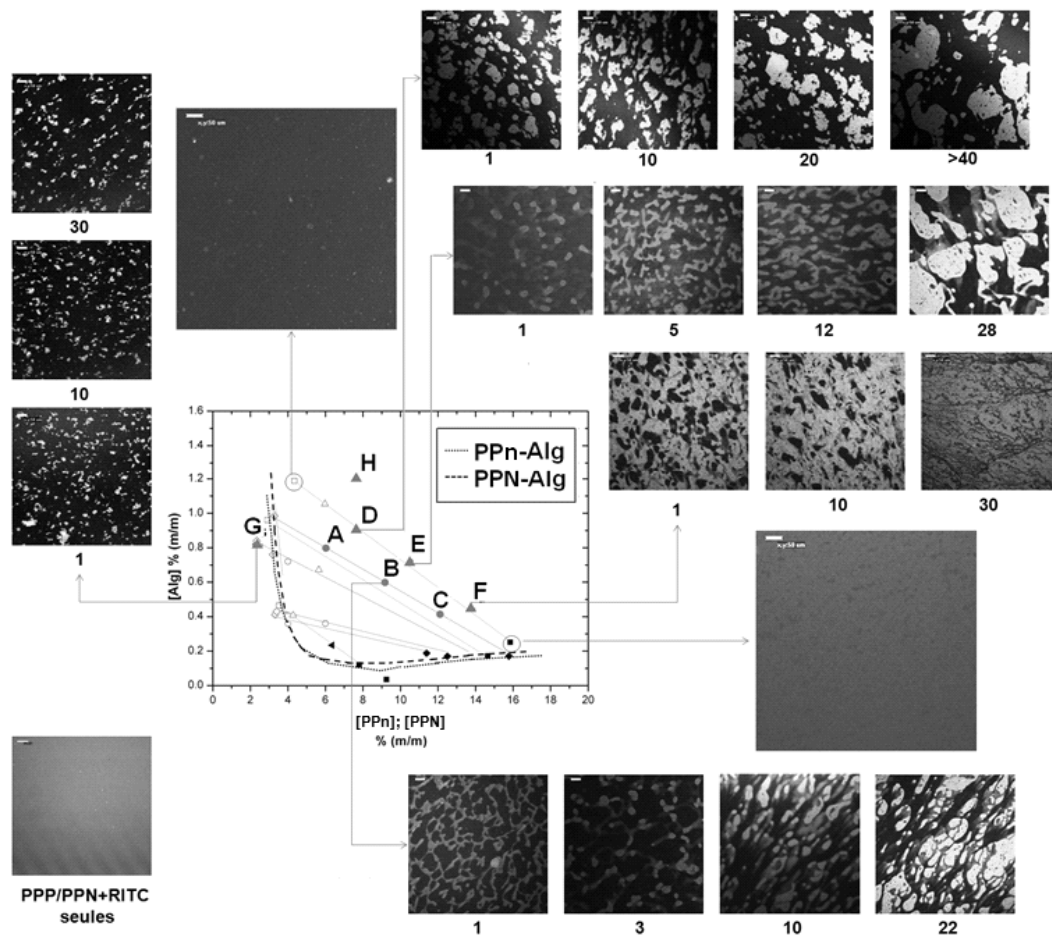


Figure 4.6 : Microstructure de différents mélanges globulines de pois (PPn ou PPN)+RITC – Alginate (Alg) selon leur position dans leur diagramme de phase respectif (d'après la **Figure 4.6**). Les protéines marquées apparaissent en clair. Les points A, B, C (PPn-Alg), ainsi que D, E, F (PPN-Alg), sont situés sur une même droite de conjugaison. Les groupes de mélanges A et D, H ; B et E ; C et F présentent pour chacun des microstructures proches. Sont présentés également l'évolution de la microstructure en fonction du temps (les temps indiqués sous les clichés sont en minutes). Plusieurs mélanges à la même composition ont été préparés pour établir les séries dans le temps. Les dimensions des images sont 636,5*636,5 μm (barre d'échelle = 50 μm).

Dans les premières minutes qui suivent la fin de l'étape d'agitation, les clichés obtenus traduisent clairement un phénomène d'inversion de phase d'un mélange D où les

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

microdomaines protéiques (PPN+RITC) sont dispersés dans une phase continue d'alginate à un mélange F où la phase protéique devient prédominante et contient des inclusions d'alginate, en passant par E où la microstructure est bicontinue. Le mélange G proche de la binodale met en évidence de nombreux microdomaines protéiques de $\approx 10\text{-}20\ \mu\text{m}$, très espacés les uns des autres. Le mélange H ne montre pas de différences de microstructure avec D.

L'ensemble de ces observations nous montre que les effets ségrégatif sont d'autant plus marqués que les mélanges sont initialement concentrés. Dès lors qu'il y a mise en contact des deux biopolymères de structures différentes, l'incompatibilité thermodynamique régit des fluctuations locales de concentration qui mènent à deux phases séparées, dont la fraction volumique dépend des concentrations initiales en protéine et polysaccharide. La fraction volumique de la phase protéique augmente en même temps qu'une augmentation de la concentration initiale en protéines. A partir de $\approx 10\text{ - }11\%$ (m/m), les microdomaines protéiques commencent à être interconnectés, formant un continuum. Les clichés semblaient indiquer qu'une telle structure en réseau pouvait contenir en ses interstices des microdomaines polyosidiques. Ce piégeage serait probablement à l'origine dans les mélanges concentrés d'une surestimation par dosage de la concentration en alginate dans la phase protéique du bas, comme cela a été mis en évidence dans des mélanges incompatibles de caséines-amylopectine ou protéines de soja- κ -carraghénanes (De Bont et al., 2002 ; Li et al., 2009).

Ainsi il a été vérifié par centrifugation (mêmes paramètres utilisés que pour l'établissement des diagrammes de phase) de plusieurs mélanges avec PPN ou PPN+RITC que (i) les phases du haut et (ii) du bas étaient pratiquement homogènes du fait qu'elles contenaient çà et là de petits microdomaines diffus de l'autre biopolymère (extrémités de la droite de conjugaison D, E, F présentée à la **Figure 4.6**) ; (i) des points faiblement fluorescents et (ii) de fines inclusions non-fluorescentes ont été détectés dans les phases du haut et du bas obtenus à partir du mélange B, respectivement.

Les microdomaines protéiques montraient à l'interface avec la phase enrichie en alginate des contours plutôt irréguliers. Il a été mis en évidence, pour une concentration initiale en PPN inférieure à 8-10% (m/m), des microdomaines protéiques sous forme de petits agrégats diffus très éloignés les uns des autres. A partir de 8% PPN+RITC, des microdomaines plus volumineux et en moins grand nombre que précédemment adoptaient une

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

forme pseudo-sphérique, et semblaient plus lisses en surface. De tels microdomaines se dissociaient par dilution en agrégats plus petits, qui ont été mis en évidence auparavant dans des mélanges moins concentrés initialement. En augmentant le temps de repos des mélanges incompatibles initialement concentrés, davantage d'agrégats étaient stables à la dilution. Cela indiquerait que les interactions inter-protéines entre agrégats se renforceraient, alors que la formation des microdomaines plus larges serait liée à des effets ségrégatifs plus forts induisant des effets de surconcentration dans les phases coexistantes (Mession et al., 2012_a – **P1**). Les interactions attractives inter-protéines étaient plus intenses en augmentant la concentration initiale en polysaccharide (Grinberg et al., 1997). Il peut être de plus mentionné que les agrégats sédimentaient plus lentement que les microdomaines, du fait de différences de densité plus marquées pour ces derniers avec la phase d'alginate visqueuse pour les seconds (Schorsch et al., 1999). Signalons enfin que la non-sphéricité des microdomaines protéiques témoignait d'une moindre réduction vers un minimum d'énergie au cours du déphasage (Butler et al., 2003) ; l'hétérogénéité de charge et de masses que l'on peut regrouper sous le terme générique de polydispersion caractéristique des globulines de pois ou l'hétérogénéité de taille des chaînes d'alginate peuvent altérer localement les fluctuations de concentration entre biopolymères non-similaires pris les uns par rapport aux autres. La complexité d'un système incompatible dès lors qu'il contient plus de trois composés (dont l'eau) rend difficile la prédiction de son comportement de phase et ne permet ainsi qu'une analyse qualitative.

Des observations similaires ont été relevées pour les mélanges A, B, C du système PPn-Alg. Ainsi, les globulines extraites à partir du pois ou de l'isolat commercial témoignaient d'un comportement de phase très proche en présence d'alginate ; **ces résultats confirmeraient de ce fait le choix de PPI comme protéines de travail dans les études de gélification qui vont suivre.**

4.2.1.2. Evolution temporelle de la microstructure

La cinétique de séparation de phase a été considérée (**Figure 4.7**). Pour les mélanges présentant une phase d'alginate continue (<8 % (m/m) PPN+RITC), les agrégats protéiques de 10-50 μm de longueur présentaient au sein d'un même mélange une polydispersion de tailles et leur éloignement semblait fortement ralentir leur rapprochement et ainsi la

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

sédimentation de la phase protéique. Dans le temps ces mélanges proches de la branche haute de la binodale évoluaient très lentement, excepté les mélanges D et H qui témoignaient une croissance des microdomaines plus rapide que dans des mélanges globalement moins concentrés ; la coalescence se produisait en une trentaine de minutes. Il pouvait apparaître un déphasage sous la lamelle, signifié par un flou de l'image de plus en plus prononcé. Cela était dû aux grandes différences de densité entre les deux phases qui soit crémaît (phase enrichie en protéines), soit sédimentaient (phase osidique). En revanche, une lente maturation a été rapportée pour des mélanges où les interfaces entre les deux phases immiscibles sont étendues (Butler et al., 2003). Concernant des mélanges proches de la branche basse de la binodale, la microstructure variait peu avec le temps. Des porosités dans la phase continue protéique (mélange F) mettaient en évidence des inclusions d'alginate emprisonnées dans la masse, qui tendaient à diminuer de taille avec le temps car expulsées par contraction et densification de la phase protéique. Le renforcement des interactions inter-protéines avec le temps pouvait empêcher l'expulsion complète de ces microdomaines, ainsi des mélanges concentrés ne semblaient pas atteindre un équilibre thermodynamique au sens strict du terme (minimum d'énergie entre les deux phases immiscibles).

Par rapport aux mélanges évoqués ci-dessus où le déphasage paraissait aléatoire autour de microdomaines protéiques localisés, le déphasage concernant des microstructures apparemment bi-continues semblait en revanche davantage « organisé » (mélanges B et E) : des structures entrelacées de microdomaines protéiques allongés et interconnectés dans une phase d'alginate ont été observées après la fin de l'agitation. Une analyse d'image par transformée de Fourier à deux dimensions a permis de mettre en évidence une distance caractéristique particulière Λ qui se répétait dans la structure (**Partie 1.2.1.6**) ; en effet, le spectre de puissance tiré des microstructures des mélanges B (système PPn-Alg) et E (PPN-Alg) montraient un maximum d'intensité qui se déplaçait avec le temps vers des fréquences spatiales plus petites (et donc une plus grande valeur de Λ) (**Figure 4.7**, mélanges B et E présentés ici). Ce maximum avait une intensité de plus en plus élevée, signifiant un plus grand nombre de fois que Λ était compté. Cette mesure était permise jusqu'à ce que la croissance des microdomaines protéiques et leur fusion par coalescence - afin de réduire la surface de contact avec la phase polysaccharidique - entraîne leur sédimentation. Ce phénomène se produit généralement autour de ≈ 30 minutes après préparation de l'échantillon.

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

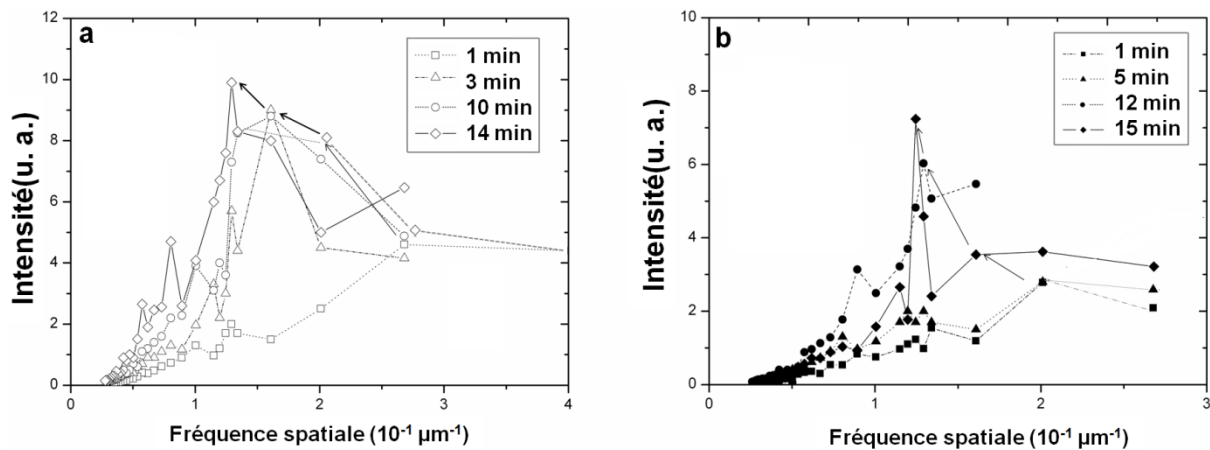


Figure 4.7 : Spectres de puissance obtenu par transformée de Fourier à deux dimensions à partir des séries d'images de microstructure des mélanges (a) : B (PPn-Alg 8-0,65%, m/m) et (b) : E (PPn-Alg 11-0,75%).

Il n'est cependant pas raisonnable de statuer sur le mécanisme de séparation de phase à partir de mesures effectuées dans les stades intermédiaire et tardif de celle-ci ; une conclusion définitive quant à un déphasage par NC ou SD est possible si Λ au cours du stade précoce est restée constante (Norton et al., 2001). En pratique, le stade précoce est difficile à observer, du moins par MCBL (De Bont et al., 2004). Néanmoins, la diffusion de la lumière aux petits angles est permise sur des systèmes peu turbides, ce qui n'était pas le cas des mélanges globulines de pois-alginate en considérant la taille des agrégats/microdomaines de plusieurs dizaines de micromètres.

Nous ferons enfin remarquer que lorsque la fraction de légumine enrichie Leg était utilisée à la place des globulines non-séparées, les effets ségrégatifs en présence d'alginate conduisaient à des microdomaines sphériques enrichis en légumine, assimilés à des gouttelettes. Ceux-ci présentaient une polydispersion de taille réduite et étaient régulièrement espacés à partir de compositions initiales suffisamment éloignées de la binodale ($\approx 6\%$ (m/m) en légumine). Au cours du temps, ces microdomaines augmentaient rapidement de taille, coalesçaient et sédimentaient sous lamelle en l'espace d'une quarantaine de minutes. Il apparaît donc que la simplification du système permettait un comportement de phase plus clairement défini, qu'avec des globulines non séparées et structurellement très hétérogènes.

L'étude du comportement de phase à l'échelle microscopique a permis de mettre en évidence deux phases coexistantes dont les fractions volumiques respectives dépendent des concentrations initiales en biopolymères, et donc de la position dans le diagramme de phase.

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »-alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

Maintenant, l'objectif est de figer de telles microstructures par la gélification de l'alginate, à froid.

4.3. Une première tentative de gélification à froid des mélanges globulines de pois « natives »-alginate

Les travaux évoqués ci-dessus ont permis de caractériser une source protéique complexe (les globulines de pois) en mélange avec de l'alginate de sodium, polysaccharide anionique dont les procédures de gélification ont été décrites dans de nombreuses études (**Partie 1.1.2.6**). La gélification à froid de quelques mélanges PPN - Alg a été entreprise. Le mode de gélification sélectionné reposait sur deux études antérieures, où l'évolution des paramètres du solvant (pH et force ionique) permettait de former des gels d'alginate, éventuellement en mélange avec des protéines natives non-globulaires, en présence de GDL et de carbonate de calcium (CC), au départ très peu soluble autour de pH 7 (Hong & Chin, 2010 ; Neiser et al., 1999). L'acidification devait être relativement lente afin d'éviter une sur-agrégation protéique préjudiciable à la tenue du gel multi-composés, en termes notamment de capacité de rétention d'eau.

Une démarche similaire a été adoptée dans le cadre de nos investigations, pour des mélanges PPN-Alg dont les concentrations initiales étaient respectivement de 8-0.8, 11-0.75 et 8-1.2 % (m/m). Les mélanges ont été choisis assez éloignés du domaine de co-solubilité (**Figure 4.2**) afin d'évaluer si les effets ségrégatifs à partir d'une concentration en alginate intermédiaire de 0,8 % (m/m) pouvaient être à l'origine d'effets de synergie dans le gel rempli formé (Tolstoguzov, 1995). Ainsi (i) le profil de gélification des mélanges, (ii) les propriétés mécaniques des gels formés et (iii) leur microstructure finale ont été investigués.

La quantité de CC dans les mélanges a été fixée à 20 mM, car celle-ci permettrait une fourniture de calcium ionique apparemment suffisante pour former des gels d'alginate à force finale intermédiaire ; travaillant dans un solvant proche du notre, Hong et al. (2010) ont utilisé 20 mM de CC avec 0,5% (m/m) d'alginate et 4% de protéines myofibrillaires, alors que Neiser et al. (1999) libéraient dans le milieu 14 mM de calcium en présence de 1% (m/m)

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

d'alginate et 8% de SAB. La concentration de GDL doit en outre être ajustée pour permettre la libération de calcium à pH acide (≈ 4). En même temps, le pH à l'équilibre peut coïncider avec le point isoélectrique des protéines, qui est de 4,5-4,8 pour les globulines de pois ; la lente diminution des répulsions électrostatiques jusqu'à leur minimum favoriserait l'agrégation protéique plutôt que leur coagulation et donc une précipitation indésirable (Bryant et al., 1998).

4.3.1. Cinétique d'acidification

Il s'agissait de déterminer d'abord la quantité de GDL en présence de 20 mM de CC, et avec ou sans biopolymères nécessaire dans l'optique d'acidifier le milieu à un pH à l'équilibre de l'ordre de 4-4,5. Une concentration en GDL de 1 % (m/m) semblait remplir cet objectif pour des mélanges à 20°C dans 0,1 M NaCl, pH 7,2 (Figure 4.8).

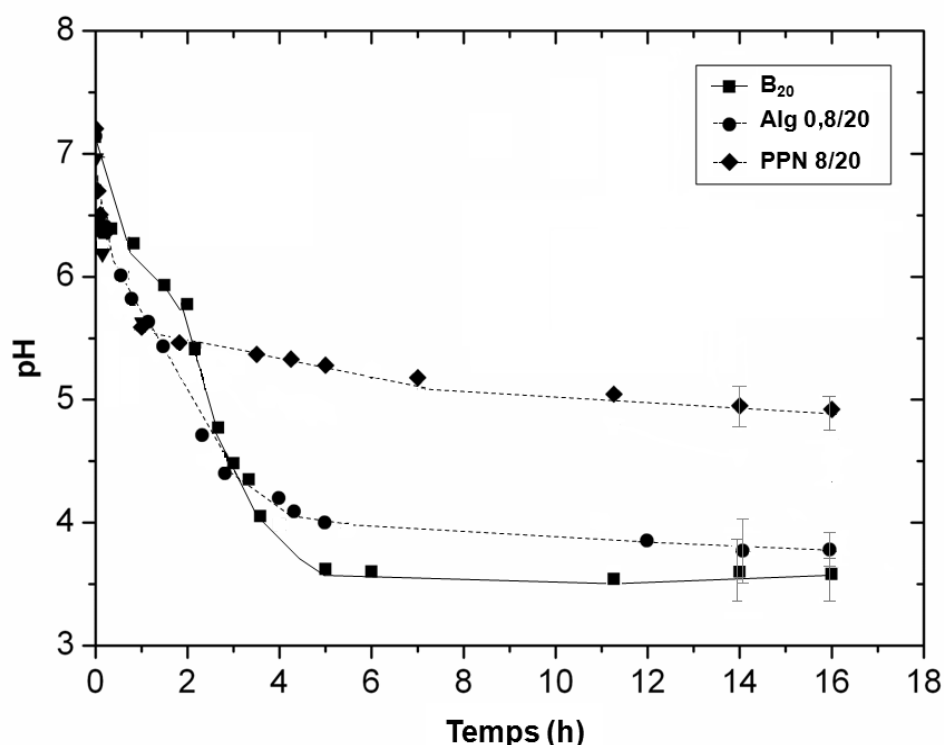


Figure 4.8 : Variation du pH à 20°C en fonction du temps pour des solutions à 0,1 M NaCl et pH 7,2 initialement, contenant 1% de GDL (m/m) et 20 mM de carbonate de calcium. Sont présentés les profils d'acidification d'une solution sans biopolymères (blanc B), d'une solution d'alginate et de globulines de pois « natives » à 0,8 et 8% (m/m), respectivement.

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

En l'absence de CC, l'ajout de 1% de GDL à la solution sans biopolymères ou avec Alg provoquait une diminution très rapide du pH, qui atteignait une valeur à l'équilibre de l'ordre de $\approx 3,2-3,5$ (données non représentées). En présence de 8% (m/m) PPN, la diminution de pH était nettement plus lente, atteignant un équilibre autour de $\approx 4,9$ après 4h d'incubation. Ainsi l'alginate n'a pas d'effet tampon remarquable, alors que les protéines tamponnaient le milieu et ralentissaient fortement l'acidification pour un pH proche de ≈ 5 , non loin de leur point isoélectrique ($\approx 4,8$).

Lorsque 20 mM de CC est introduit dans le milieu, l'acidification était plus progressive dans tous les cas. Le profil de la solution B₂₀ montrait un effet contre-acidifiant attribué à la libération d'ions carbonate en même temps que le calcium (Hong et al., 2010). Il est à noter un premier ralentissement de l'acidification entre 10 min (pH $\approx 6,3$) et 2h ($\approx 5,7$), avant que celle-ci redevienne plus rapide jusqu'à un pH de $\approx 4,2$. Le ralentissement serait dû à la libération abrupte de carbonates consécutive à la diminution abrupte de pH de 1 unité dès le début de l'incubation avec GDL/CC. La reprise témoignerait de la neutralisation des carbonates et d'une libération plus lente de ceux-ci à partir d'un pH de $\approx 5,8$. Enfin, la diminution quasi-stationnaire jusqu'au pH final reflèterait les équilibres entre GDL et acide gluconique formé et entre CC et carbonates libérés (Hong et al., 2010).

Contrairement à ce que ces derniers auteurs cités ont observés, l'acidification était plus rapide en présence d'alginate et quelque soit sa concentration (non montré, testé également à 0,4%, m/m), il n'était en revanche pas possible de travailler à 1,2 % en raison du fort gain de viscosité dans le temps qui perturbait les mesures de pH). Cela signifierait que les ions carbonate et donc le calcium seraient libérés plus lentement dans le milieu. L'effet épaississant de l'alginate lorsque le calcium se libère et se complexe aux chaînes semblerait ralentir la dissociation de CC (Funami et al., 2009) ; l'hypothèse la plus simple à émettre serait une plus lente hydratation de CC en présence d'alginate. Ceci indiquerait que l'alginate n'accélérait pas la dissociation de CC par capture du calcium libre, pour une raison supposée de plus lente diffusion du calcium libre dans un milieu à viscosité croissante dans le temps.

Concernant PPN, le profil d'acidification était très proche de celui sans CC ; l'effet tampon des protéines était prédominant sur celui des ions carbonate libérés.

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

A une concentration plus élevée (11%, m/m), 1,15% de GDL devait être ajouté afin que le profil d'acidification colle à celui obtenu à 8%

Par ailleurs, il a été vérifié dans des mélanges PPN - Alg à 8-0,8 % (m/m) que le profil d'acidification suivait celui de la protéine seule, à quelques écarts de l'ordre de $\pm 0,2$ unités de pH. De ce fait, ce sont les protéines qui réduisent la vitesse d'acidification du mélange. Le pH atteint à l'équilibre est de $4,7 \pm 0,25$ après 16h d'incubation, ce qui était notre objectif de départ.

4.3.2. Suivi de la gélification

4.3.2.1. Rhéologie dynamique aux faibles déformations

L'évolution à 20°C des modules de stockage G' et de perte G'' a été suivie au cours de l'incubation par GDL/CC des mélanges PPN - Alg (**Partie 3.1.1.2**, compositions dans le **Tableau 3.3**). D'une part, l'acidification réduit les répulsions électrostatiques entre biopolymères. D'autre part, la dissociation de CC et la libération de calcium entraîne la complexation des chaînes d'alginate et la formation d'un réseau gélifié. Maintenant la question est de savoir si l'ajout des globulines natives à l'alginate occasionnerait un gain d'élasticité par rapport à un gel d'alginate seul.

Une transition sol-gel est signifiée par le croisement des deux modules G' et G'' ($\tan \delta = 1$) au point gel G_p , suivi d'une augmentation marquée de G' , significative d'un renforcement du réseau formé. Le matériau passe ainsi d'un état liquide/visqueux avec $G'' < G'$ à un état élastique dominant à partir de G_p , avec $G' \gg G''$. Le mélange atteint un équilibre lorsque les deux modules sont pratiquement stables, fluctuant généralement à $\pm 10\%$ autour d'une valeur moyenne. Celle-ci a été relevée comme la valeur finale d'élasticité du gel. La **Figure 4.9a-b** présente deux manières de représenter les profils de gélification en suivant l'évolution de G' . Afin de s'affranchir du temps d'hydrolyse de la GDL et de dissociation de CC (effet contre-acidifiant), le profil de G' en fonction du pH au cours de l'acidification est préférable (**4.9b**).

4. Un système incompatible globulines de pois « natives » – alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

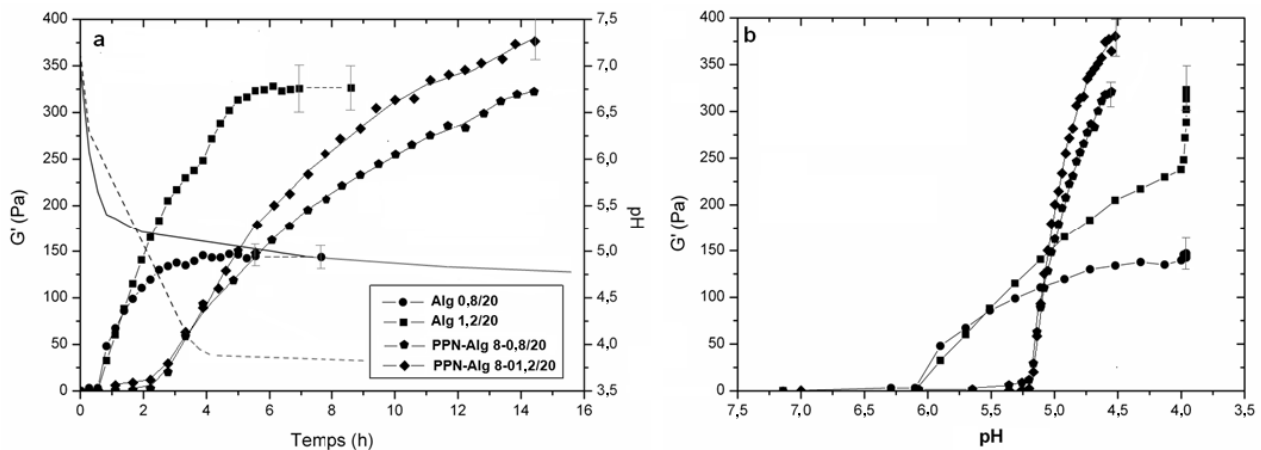


Figure 4.9 : Evolution à 20°C du module élastique G' pour des solutions d'alginate seul (Alg) ou en mélange avec des globulines de pois « natives » PPN - Alg, à 8% (m/m), dans 0.1 M NaCl. La gélification est induite par ajout de 1% de GDL et 20 mM de carbonate de calcium. (a) : Représentation en fonction du temps ; (b) : en fonction du pH. Sur (a) ont été ajoutés les profils d'acidifications en présence d'Alg (courbe continue) ou de PPN (courbe en pointillés) établis à la **Figure 4.8**.

• Gélification de l'alginate seul

Les gels d'alginate étaient transparents. Quelques particules de CC non dissocié ont été observées dans le fond du tube de préparation. Il a été vérifié que l'alginate seul avait un comportement newtonien à faiblement rhéofluidifiant à 1.2% (m/m) (Messiou et al., 2012_a – P1).

Le point gel G_p pour les solutions d'alginate à 0,8 et 1,2 % (m/m) se produisait dans un intervalle de temps de l'ordre de $\approx 28-34$ min et $\approx 1-6,3$ min, respectivement, pour des valeurs de pH de $5,98 \pm 0$ et $6,3 \pm 0,2$. Une augmentation de la concentration en alginate tendrait à rapprocher davantage les chaînes, favorisant leur complexation via le calcium. Le rhéomètre serait sensible à la formation locale de micro-gels pour des solutions concentrées d'alginate, avant que l'ensemble des chaînes agrégées soient impliquées dans un réseau gélifié continu. En effet G' augmentait significativement à partir de pH ≈ 6 . Cela indiquerait également que l'alginate gélifierait au début de l'incubation à des concentrations assez faibles en calcium dans le milieu. Cet élément conforterait le résultat de la **partie 4.1.2.2, Figure 4.2**, à partir duquel l'échantillon d'alginate avait été qualifié de flexible, et donc visiblement dépourvu de longues séquences homopolymériques en G (Fang et al., 2007 ; Funami et al., 2009). Le séquençage de l'alginate permettra de déterminer définitivement son contenu en monomère G et leur enchaînement (voir ci-après, **partie 5.2.2**).

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »-alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

L'évolution de G' traduit une gélification plus rapide et un gel finalement plus élastique en augmentant la concentration en alginate, probablement du fait d'une densification du réseau et d'un plus grand nombre de liaisons inter-chaînes via le calcium entre les zones de jonction (Liu et al., 2003). Il a été observé que la prise en gel était plus marquée au cours de l'acidification quasi-stationnaire à partir de pH 4 ; cela était flagrant pour le gel d'alginate à 1,2 % (m/m) (**Figure 4.9b**). Cela indiquerait que le calcium continuait à se complexer à l'alginate même si le pH d'équilibre est pratiquement atteint. Egalement la diffusion du calcium pourrait être ralentie jusqu'aux sites de liaisons, non encore occupés. De ce fait, le calcium se lierait rapidement et localement complexant partiellement les chaînes. Puis avec le temps des réarrangements inter-chaînes seraient prévisibles à une concentration plus haute en calcium libéré, conduisant à une meilleure saturation des zones de jonction. En revanche à 0,8% (m/m), un point gel plus tardif permettrait dès le départ une agrégation moins aléatoire et probablement une saturation des zones de jonction plus aboutie.

On peut mentionner que 20 mM de CC serait un maximum à ne pas excéder. En parallèle, il a été testé un autre couple GDL/CC appliqué à une solution d'alginate à 0.8 % (m/m). La quantité de CC a été augmentée à 30 mM et la quantité de GDL ajustée afin que l'acidification puisse se dérouler à la même cinétique qu'à 20 mM. Dans ce cas précis, G_p se produisait à pH $6,3 \pm 0,1$ suivi d'une augmentation rapide de G' jusqu'à un maximum autour de 120 Pa. Puis ce même module diminuait à partir de pH 6, reflétant sûrement une déstabilisation du réseau. Par comparaison, Donat et al. (2007) ont mis en évidence que des gels d'alginate riches en séquences poly alternés MG tendaient à s'écrouler pour des concentrations en calcium supérieures à 18-20 mM du fait de l'implication de zones de jonction secondaires GG/MG et MG/MG. Cela constituait un signe supplémentaire que notre alginate serait particulièrement polyalterné.

- **Gélification des mélanges globulines « natives »-alginate**

Il a été vérifié au préalable qu'une solution de globulines « natives » ne pouvait gélifier. Un point gel était cependant atteint sans que G' montre une augmentation significative, stagnant autour de ≈ 3 Pa). Il s'agissait plutôt d'une coagulation.

Les gels obtenus à partir des mélanges PPN-Alg étaient opaques, traduisant la présence de particules supérieures à 1 μm emprisonnées dans la structure. Pareillement aux gels d'alginate, aucune synérèse n'a pas été observée visuellement. Les points gels G_p ont été

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

atteints entre 17-22 min, 37-50 min et 57-127 min pour les gels 8-0,8/20, 11-0,75/20 et 8-1,2/20, respectivement. Les valeurs de pH correspondantes étaient de $6,08 \pm 0,2$ pour les deux premiers mélanges et $5,4 \pm 0,27$ pour le dernier. Cela dit, l'augmentation rapide de G' s'opère à partir de $\text{pH} \approx 5,3$ dans tous les mélanges ; le renforcement du réseau d'alginate nécessite un apport suffisant en calcium, atteint lorsque la diminution de pH du mélange est stationnaire.

Les protéines pouvaient potentiellement complexer le calcium, diminuant ainsi le calcium disponible pour l'alginate. En revanche, la valeur de pH correspondante à G_p plus basse en augmentant la concentration en alginate à 1,2 % (m/m) plus basse que l'alginate seul indiquerait une fourniture plus importante en calcium afin d'enclencher la gélification. Egalement la neutralisation des charges négatives des protéines par acidification réduirait son affinité pour le calcium, alors que cette même affinité serait peu affectée pour l'alginate dans un domaine de pH de 3-10 (Nussinovitch, 1996). En dépit d'une acidification atténuée par PPN, le profil de G' en fonction du pH était particulièrement pentu puisque le pH atteint à l'équilibre était de $\approx 4,7$, plus élevé que pour l'alginate seul (**Figure 4.9b**). Le profil de G' pour le mélange 11-0,75% (m/m) (non montré) se superposait à celui de 8-0,8 %. Une concentration plus élevée en protéines ne diminuait pas de manière marquée l'élasticité finale du gel, puisque tous les gels PPN-Alg remplis présentaient pratiquement le même G' final. L'alginate présenterait une affinité nettement plus prononcée envers le calcium que les protéines, même si celle-ci était au moins dix fois plus concentrées dans le mélange (Neiser et al., 1999). Il en est de même pour des pectines faiblement méthylées en présence de SAB ou β -lactoglobuline (Beaulieu et al., 2001 ; Donato et al., 2005). Malgré une acidification globalement plus faible, les valeurs finales d'élasticité des gels montraient un gain par rapport aux gels d'alginate seul ; cette élasticité pratiquement doublait entre le gel d'alginate seul et les gels remplis à 8-0,8% et 11-0,75% (m/m). Il ne pourrait y avoir davantage de calcium libéré par acidification, aussi cette libération serait beaucoup plus lente dans le temps. Une explication possible serait des effets ségrégatifs dans de tels mélanges incompatibles qui provoqueraient un rapprochement des chaînes dans une phase enrichie en alginate, et ainsi une agrégation induite à une concentration plus faible en calcium libre. Cet effet de concentration induit par ségrégation des biopolymères dans deux phases séparées conduirait à un réseau d'alginate plus dense présentant un plus grand nombre de jonctions entre zones enrichies en G complexant le calcium. La probabilité que deux zones de jonction via le calcium entre deux chaînes serait augmenté par rapport à une solution d'alginate seul à la

4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

même concentration. D'ailleurs cette concentration en alginate dans sa phase enrichie serait de l'ordre de $\approx 1,2\%$ (m/m) d'après le diagramme de phase (**Figure 4.5**), ce qui donnait effectivement une élasticité de gel comparable au gel d'alginate seul à cette concentration initiale... et finale dans le mélange incompatible. De ce fait, des gels remplis PPN-Alg présenteraient effectivement un effet de synergie, où les protéines joueraient un rôle ni plus ni moins de remplissage dans les interstices d'un réseau d'alginate.

- **Propriétés mécaniques des gels formés :**

Lorsque les modules G' et G'' étaient stables (≈ 1 h), le spectre mécanique a été établi pour les gels d'alginate seuls et en mélange avec NPP (**Figure 4.10**).

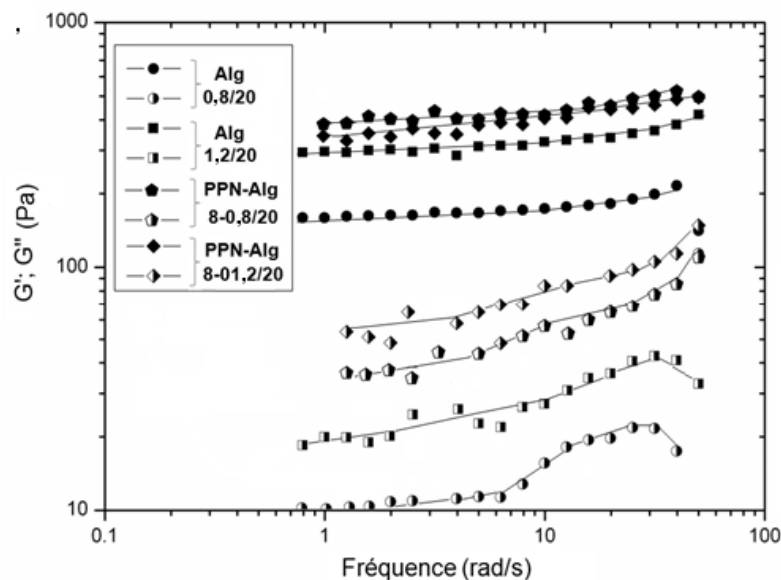


Figure 4.10 : Spectres mécaniques à 20°C pour des gels d'alginate seul (Alg) ou en mélange avec des globulines de pois « natives » PPN-Alg à 8% (m/m) obtenus en fin de gélification (≈ 6 h pour l'alginate, ≈ 16 h incubation pour les mélanges). Les symboles pleins correspondent à G' , à demi-pleins à G'' .

Dans les deux cas, le module G' montrait une faible dépendance à la fréquence jusqu'à atteindre un plateau dans les basses fréquences. Le module G'' quant à lui est fortement dépendant notamment aux fréquences faibles, ce qui est caractéristique de gels viscoélastiques à composante visqueuse marquée (Funami et al., 2009 ; Liu et al., 2003). Outre le fait que davantage de zones de jonctions seraient impliquées dans le gel rempli, moins de calcium serait lié pour permettre l'agrégation des chaînes d'alginate. Egalement les des particules protéiques non gélifiées et dispersées dans le mélange pourraient gêner la

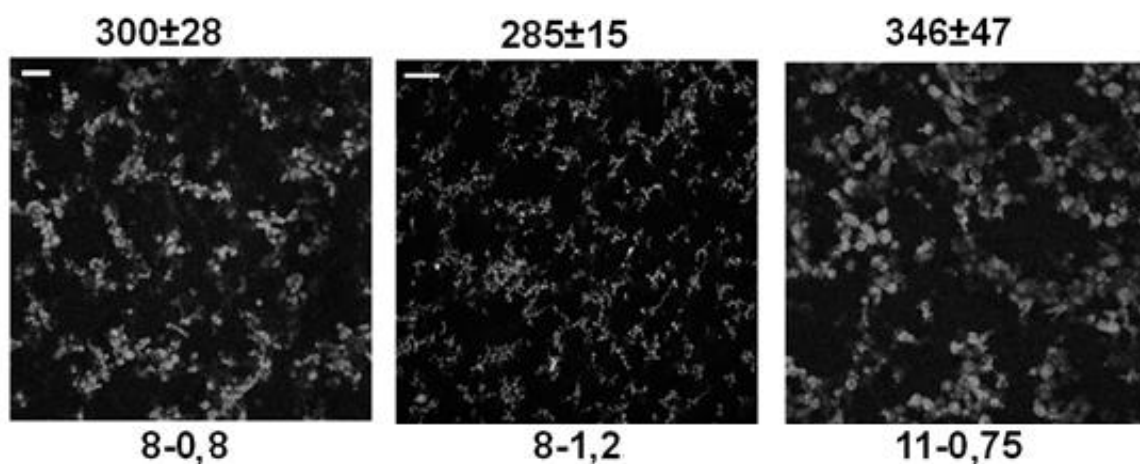
4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

formation du réseau d'alginate Ce comportement viscoélastique est caractéristique de gels de polyosides. Un réseau d'alginate est donc prédominant dans la structure des gels remplis.

Il est à noter que les valeurs finales de $\tan \delta$ pour les gels d'alginate seul étaient de l'ordre de 0,06, alors que ces valeurs pour les gels PPN-Alg étaient plutôt de 0,09-0,13. Cela reflèterait l'emprisonnement dans le gel rempli de microdomaines à l'état liquide et désordonné, conférant au final une plus grande composante visqueuse au gel. Dès à présent, des observations au MCBL permettent d'investiguer la microstructure des gels.

4.3.2.2. Données de microstructure

La microstructure des gels PPN-Alg 8-0,8/20, 11-0,75/20 et 8-1,2/20 met en évidence deux phases coexistantes, où la phase protéique est sous forme de granules agglomérées dispersées dans une phase continue d'alginate (**Figure 4.11**). La phase protéique présentait de fins microdomaines granuleux dispersés et désorganisés, ainsi l'alginate formerait un réseau continu contenant des microdomaines protéiques faiblement interconnectés. Il n'y a pas de réseau protéique à proprement parlé ; ces derniers joueraient donc un rôle d'occupant de l'espace et ainsi les effets ségrégatifs concentrent l'alginate dans sa phase séparée. Il peut être supposé que l'augmentation de viscosité précédant la prise en gel ralentit fortement la séparation de phase et ainsi les microdomaines protéiques ne peuvent coalescer en plus grands domaines. Par rapport à la microstructure en conditions non-gélifiantes, la taille réduite des microdomaines indiquerait d'une part (i) que la séparation de phase a été bloquée, sinon fortement ralentie rapidement. D'autre part, (ii) la capture d'une partie du calcium par les protéines, entraînerait leur coagulation par neutralisation de leur charge de surface.



4. Un système incompatible globulines de pois « natives »– alginate; de la séparation de phase à une gélification à froid

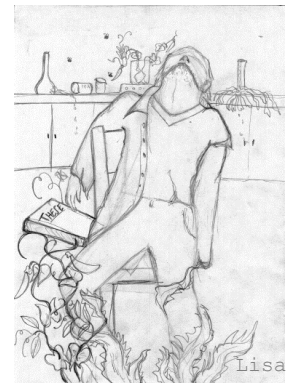
Figure 4.11 : Clichés au MCBL des gels remplis de globulines de pois natives-alginate PPN-Alg, après 16 h d'incubation à 20°C en présence de 1% de GDL (1,15% pour le gel 11-0,75%) et 20 mM de CC. Est indiquée également la valeur d'élasticité finale G' (Pa). Barre d'échelle =50 μm .

Cette partie nous a montré que nous pouvions effectivement obtenir des gels remplis à partir de mélanges PPN-Alg. L'enrichissement de l'alginate par des effets ségrégatifs est un signe de synergie pour ces gels. Toutefois, les gels présentaient des propriétés mécaniques typiques d'un gel faible à intermédiaire dominé par un réseau polyosidique.

Aussi il nous semblait plus avantageux sur le plan de la variété de textures d'utiliser deux agents gélifiants en mélange, donnant lieu à des réseaux protéique et/ou polyosidique aux propriétés rhéologiques bien distinctes. De ce fait, il nous fallait rendre la protéine potentiellement gélifiante, et cela ne pourrait se réaliser sans une dénaturation, thermique pour des raisons de praticité. Rappelons qu'une contrainte imposée était d'opérer une gélification non thermique, d'où la nécessité de pré-dénaturer les protéines avant d'ajouter un polysaccharide et d'obtenir des gels à froid de manière similaire à ce qui a été décrit ci-dessus.

La partie qui suit reprend le même plan que cette dernière, à la nuance près que les globulines de pois ont été agrégées thermiquement au préalable.

5. Un système incompatible globulines de pois pré-agrégées thermiquement - alginate; entre séparation de phase et gélification à froid



Ups & downs...

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

5.1 Préparation d'agrégats de globulines de pois et comportement de phase en mélange avec de l'alginate

5.1.1. Enjeux

Dans cette partie présentée sous forme d'un article à part entière, nous nous sommes proposés de caractériser une solution d'agrégats protéiques élaborée par traitement thermique d'une solution de globulines « natives » à 8% (m/m). Une telle concentration nous permettrait ensuite d'étudier un nombre large de formules de mélanges, du fait de la dilution de la solution d'agrégats par ajout de différentes concentrations d'alginate.

D'abord, (i) les paramètres thermiques des globulines en solution à pH $7,5 \pm 0,1$, sans sels ajoutés ou en présence de 0,1 M NaCl à deux vitesses de chauffage ($10^\circ\text{C}/\text{min}$ et $5^\circ\text{C}/\text{min}$) ont été mesurés par DSC. L'effet d'agents perturbants tels que le N-éthylmaléimide (NEM) ou le DTT à une concentration de 10 mM ajoutés avant la dénaturation a été évaluée afin de déterminer les interactions intra et inter-protéines mises en jeu au cours du traitement thermique. Un chauffage plus lent à $4,2 \pm 0,2^\circ\text{C}/\text{min}$ a été retenu pour que la dénaturation des globulines soit plus progressive (Sun et al., 2011). Une température d'incubation à 90°C pendant 1h ($>78^\circ\text{C}$, valeur de T_d des globulines déterminé préalablement en chauffant à $5^\circ\text{C}/\text{min}$) a été choisie. Un dessalage au préalable de la solution de globulines natives occasionnait des répulsions électrostatiques maximales dans la solution au pH alcalin de travail, aussi l'agrégation consécutive à la dénaturation devrait s'opérer plus lentement et de manière moins aléatoire (Bryant et al., 1998).

Par la suite, (ii) le profil électrophorétique des agrégats APP a été caractérisé par SDS-PAGE. En outre, (iii) le passage de globulines d'un état (quasi-) natif à un état pré-dénaturé a été considéré par SEC-HPLC, en utilisant deux colonnes d'exclusion différentes, tout en s'assurant de l'absence de globulines faiblement dénaturées dans la solution d'agrégats et que ceux-ci sont stables à la dilution. Des informations (iv) sur la taille des agrégats et leur conformation pouvaient également provenir de mesures de viscosité intrinsèque.

Enfin, (v) différents mélanges de protéines pré-agrégées APP-alginate ont été réalisés afin de caractériser le comportement de phase d'un tel système en termes de diagramme de phase, ainsi que la maturation de la microstructure dans le temps. Enfin, la rhéologie dynamique pouvait renseigner sur le comportement de certains mélanges concentrés qui

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

témoignaient d'une faible gélification de la phase protéique, probablement induite par effets de concentration.

5.1.2. Construction d'un système immiscible globulines de pois pré-agrégées-alginate

Cette partie se décompose en deux temps : d'abord dans la **sous-partie 5.1.2.1**, nous nous sommes proposés d'étudier le phénomène de pré-aggrégation thermique des globulines de pois extraites initialement avec un faible niveau de dénaturation. Ceci est l'objet du **Manuscrit d'article 1** qui figure ci-dessous (**en anglais, les passages en italique sont des compléments qui ne figurent pas dans la version de l'article**). Puis dans la **partie 5.1.2.2** sera traitée la séparation de phase dans des mélanges globulines de pois pré-agrégées – alginate, **les paramètres de solvant (20°C, 0,1 M NaCl, pH 7,2) sont strictement les mêmes que dans le cas des mélanges avec les protéines (quasi-) natives.**

5.1.2.1. Dénaturation thermique des globulines de pois (*Pisum sativum L.*) – interactions moléculaires induites par le chauffage menant à l'agrégation protéique (Manuscrit 1)

Thermal denaturation of pea globulins (*Pisum sativum L.*) – molecular interactions leading to heat-induced protein aggregation

Abstract

The heat-induced denaturation and aggregation of mixed pea globulins (8 wt%) was investigated using differential scanning calorimetry (DSC), SDS-PAGE, and size-exclusion chromatography (SEC-HPLC). By DSC, denaturation temperature in the range of $\approx 80^\circ\text{C}$ was shown to decrease with heating rate (from $10^\circ\text{C}/\text{min}$ to $5^\circ\text{C}/\text{min}$). Upon heating at 90°C , SDS-PAGE revealed that protein denaturation and aggregation was mainly governed by non-covalent interaction. The SEC-HPLC data indicated that most of (quasi-) native legumin ($\approx 350\text{-}410$ kDa) and vicilin/convicilin (≈ 170 kDa) unfolded and re-associated into soluble

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

aggregates of high-molecular weight (> 600 kDa). Adding N-ethylmaleimide would alter slightly aggregation route of pea globulins, producing larger aggregates than those obtained with the protein-control sample. However in presence of dithiothreitol, macro-aggregates partially insoluble were obtained, significant of the stabilizing effect of disulfide bonds within legumin subunits. The techniques employed here would help to yield tailored protein aggregates, before considering cold-set gelation procedure in a further work.

Keywords: *Pisum*, Pea globulins, legumin 11S, vicilin 7S, heat-denaturation and aggregation, interaction

1. Introduction

Physicochemical properties of proteins are affected by solvent parameters (pH, ionic strength, temperature). Under certain circumstances, extrinsic modifications of solvent could induce irreversible intra- and inter-molecular rearrangements. Peculiar conditions allowing globular proteins gelation are of outstanding interest, since better control allowed modulating textural and rheological features of the gelled food product (Clark et al., 2001). The prerequisite for such protein “functionalization” was obviously tailored heat-treatment promoting denaturation of the compact globulin structure and subsequent aggregation.

Owing to worldwide pressures on water and energy demands, greater utilization of plant proteins for human food rather than animal ones appears more sustainable (Davis et al., 2009; Lunqvist et al., 2007). Generally produced for livestock diet, pulse proteins would exhibit relevant physicochemical properties to valuate, given that their low cost and environmental impact (Boye et al., 2011). Thus emphasis would be to substitute, unless partially, ingredients from animal production, e. g. whey proteins (Cayot et al., 1998). Alternative protein sources such as pea would counterbalance at the same time the monopoly position of soy protein isolates (USDA, 2012).

Protein is the second compartment of dry pea seeds ($\approx 23\%$), which are in majority globulins ($\approx 70\%$) (Guéguen, 1983; Tzitzikas et al., 2006). Those are composed of legumin 11S and vicilin/convicilin 7S. Legumin of molecular weight (Mw) in the range $\approx 330\text{-}410$ kDa is hexameric. Each subunit of ≈ 60 kDa is constituted of two polypeptides, one acidic α ($\approx 35\text{-}43$ kDa) and one basic β ($\approx 19\text{-}23$ kDa) bound together via a disulfide bridge (Gatehouse et al.,

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

1980). Vicilin (≈ 150 - 190 kDa) is a mixture of trimeric proteins, originating from the *in vivo* proteolysis of a precursor of ≈ 50 kDa, producing smaller polypeptides α (≈ 20 kDa), β (≈ 13 kDa) and γ (≈ 12 - 16 kDa) (Gatehouse et al., 1981). Two cleavage sites were possible, which were not reported to modify basically Mw nor charge of vicilin proteins (Tzitzikas et al., 2006). Contrary to legumin, no disulfide bond was involved between vicilin subunits. Usually a purified fraction of vicilin is contaminated by a third globulin named convicilin, of trimeric structure (Mw ≈ 210 kDa), with subunits of ≈ 71 kDa (Croy et al., 1980). In spite of their homology in amino acid composition, convicilin distinguishes from vicilin by a N-extension highly charged close to the C-terminus. In contrast with vicilin/convicilin practically devoid of sulfur-amino acid, each legumin subunit would contain up to four methionine and seven cysteine residues (Guéguen et al., 1983; Croy et al., 1980). Heterogeneity among pea globulin is as well attributed to a ratio legumin-to-vicilin ranging from 2 to 4, depending on pea cultivar and genotype (Tzitzikas et al., 2006).

Contrary to soy proteins, a few papers focused on thermal gelation of pea globulins (O’Kane et al., 2004_{a-c}; Shand et al., 2007; Sun et al., 2010, 2011, 2012; O’Kane et al., 2005). In addition to processing parameters applied to allow their gelation, pea globulins heterogeneity affected the textural properties of heat-set gels. Besides, pea globulins would produce weaker gels than their soy counterparts; for the former ones, gelation appeared to be governed mainly by non-specific interactions, while higher involvement of sulfhydryl/disulfide bonds (S⁻/SS) exchange reactions was reported for the latter ones (Shand et al., 2007).

Alternatively, gelation of globular proteins could be performed under cold conditions (Bryant et al., 1998). This process consisted of two dissociated steps. First, soluble protein aggregates were obtained by heating above denaturation temperature the solution below the protein critical gelling concentration (< 10 wt%), at pH far from the isoelectric point and low ionic strength to avoid protein over-aggregation. Then electrostatic repulsions between pre-aggregated proteins were reduced gradually at ambient temperature to induce their assemblage into structured network (Ju et al., 1998_a). By adding different amounts of calcium cations, Maltais, Remondetto, Gonzalez, & Subirade (2005) obtained pre-aggregated soy globulins cold-set gels displaying a wide range of structural characteristics. Complexity could be as well incremented by adding a gelling polysaccharide to the pre-aggregated protein solution, before the second step of the cold-set gelation process; Pires Vilela et al. (2011)

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

obtained by slow diffusion of calcium cold-set mixed gels made of pre-aggregated soy proteins and gellan gum. Those exhibited higher gel strength and lower syneresis than single-protein gels. Those authors ascribed such a synergistic effect to gelation entrapping phase separation, occurring generally between dissimilar biopolymers in admixture (Tolstoguzov, 1995). Clearly, microstructures of interest could be modulated with interspersed molecular aggregation leading to network formation and thermodynamic incompatibility phenomena¹. Since literature is scarce on the thermal denaturation of plant proteins, especially pea, emphasis was to investigate first the influence of the heating step on the protein aggregates produced, to allow not only better control of the textural properties, also versatile applications of the gelled biomaterial. Cold gelation of pre-aggregated pea proteins-anionic polysaccharide in the presence of calcium will be the subject of a further study (to be published elsewhere – *à noter qu’il s’agit de la partie 5.2 qui suivra*).

Following our previous works dealing with pea globulins extraction and physico-chemical characterization (Mession Assifaoui, Lafarge, Saurel & Cayot, 2012_{a,b} – **P1 & P2**), the aim of this present study is to investigate thermal denaturation and aggregation of pea globulins, at neutral pH and low ionic strength. For that, thermal properties of pea globulins were investigated by DSC analysis. Then SDS-PAGE and SEC-HPLC could bring information on molecular interactions induced by heat-treatment and size of aggregated proteins.

2. Material and Methods

2.1. Extraction of Pea Globulins

Low-denatured globular Pea Proteins isolate (PPI) were extracted from defatted Nutralys[®] S85M isolate (Roquette SA, Lestrem, France), as previously described (Mession et al., 2012_{a,b} – **P1 & P2**). PPI contained 92.5 wt% proteins, as determined by the Kjeldahl method (nitrogen to protein conversion factor of 6.25) (AACC, 1982), and 7.36 wt% ashes (d. b.). All other reagents and chemicals purchased from Sigma-Aldrich were on analytical grade.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

2.2. Preparation of Heat-Induced Aggregates

PPI powder was suspended at 16 wt% in deionized water (DW) and stirred at room temperature until complete dissolution (≈ 2 h). The protein solution was desalted by extensive dialysis against water (protein solution-to-water 1:10, 4 changes for 24 h at 4°C). The pH was 7.4 ± 0.15 . The protein concentration was adjusted to 8 wt% by adding DW. This solution was named LPP-control, containing low-denatured pea proteins according to extraction procedure (Mession et al., 2012_a – **P1**).

In the following set of experiments, the effect of structure perturbants NEM or DTT was evaluated on the thermal denaturation of LPP. NEM and DTT agents inhibit sulfhydryl/disulfide bonds (S⁻/SS) exchange reactions by blocking free sulfhydryl groups and reducing disulfide bonds, respectively (Sun et al., 2012). For that, each reagent powder was added separately to the LPP solution to reach 10 mM final concentration, and stirring at room temperature was maintained until complete dissolution (≈ 2 h). The LPP+NEM and LPP+DTT solutions were thence obtained.

Each LPP solution was poured in a large vessel hermetically sealed, and placed in an mineral oil bath previously equilibrated at 40°C, then heated at $4.3 \pm 0.2^\circ\text{C}/\text{min}$ from 40°C to 90°C, incubated at 90°C for 1 h, cooled in ice for at least 2 h and thereafter stored at 4°C until further utilization. The APP samples (APP-control, APP+NEM and APP+DTT solutions) were centrifuged (12000g, 25 min, 25°C) and supernatants were characterized, as listed below.

2.3. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Onset temperature (T_{onset}), Temperature of denaturation (T_d) and enthalpy of denaturation (ΔH_d) were evaluated by DSC, using a Q20 calorimeter (TA Instruments, Newcastle, DE, UK), beforehand calibrated with indium¹⁵. Each LPP solution (8 wt%) was weighed in an aluminum pan, hermetically sealed, and heated from 20 to 110°C at either 5 or 10°C/min. To check the effect of salt, an additional LPP solution in 100 mM NaCl and pH 7.2 was prepared, as previously described (Mession et al., 2012_b – **P2**). An empty pan was used as a reference. One replicate of each sample was re-heated after cooling to check that denaturation was irreversible. Thermograms were computed with the TA Universal Analysis Program (Version 4.5).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

2.4. Free Sulfhydryl Contents Determination

The free sulfhydryl content of protein samples was determined using 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), namely Ellman's reagent (Ellman, 1959). Protein solutions were extensively dialyzed at 4°C against a 0.1 M Na₂HPO₄ buffer at pH 7.5. The reaction mixture at pH 7.5 was prepared by mixing the protein sample (1 wt%) with guanidium hydrochloride (GDNHCL, 2M) and DTNB (1mM)., then stirred vigorously and left in dark at room temperature for 15 min. Absorbance was read at 412 nm using a re-evaluated extinction coefficient ϵ for DTNB at 13250 g.mol⁻¹.cm⁻¹. The free sulfhydryl content was expressed as $\mu\text{M S}^-/\text{g protein}$.

2.5. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

The Protein samples were run on SDS-PAGE continuous gels (10% acrylamide and 0.1 % (w/v) SDS) (Laemli, 1970) Reaction mixtures were prepared by mixing each protein sample (1 wt%) with either DW (control), or SDS (5%, w/v), or SDS+urea (5%, w/v and 3 M, respectively), or SDS+DTT (for each 5%, w/v), and left for \approx 16 h at room temperature. Thereafter each reaction mixtures was centrifuged (10000g, 25 min, 25°C), then diluted to 5 mg_{protein}.mL⁻¹ in the sample buffer (62.5 mM tris-HCl, pH 6.8; 10% glycerol, w/v; 0.005% bromophenol blue, v/v and 0.2% SDS, v/v). On each well was deposited a volume containing 10 μg of protein. Gels were run at 10 mA and 185 V for \approx 5 h. Wide range molecular weight markers (S8445, Sigma) were prepared according to the instructions. Proteins were stained with Coomassie Blue R-250. Polypeptide composition by densitometric analysis on destained gels was performed using SigmaScan[®] Pro (Systat Software Inc., Version 5, San Jose, CA).

2.6. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The Size Exclusion chromatography (SEC-HPLC) system consisted of a Waters 600s controller, a 616 pump and a 996 photodiode array detector (Waters, Milford, MA). First, the column was a Superdex 200 10/300 GL model (10x300 mm - GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The column was equilibrated with a 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.2 and 50 mM NaCl elution buffer. The flow rate was 0.4 mL/min. Alternatively, a Discovery[®] BIO GFC 500 column (4.6*300 mm, Supelco, Bellefonte, USA) was used, pre-equilibrated with a 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.2 and 100 mM NaCl elution buffer. This time the flow rate was 0.15 mL/min. Each column was pre-calibrated separately with a set of wide Mw protein standards (MWGF

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

1000-1KT 29-700 kDa, Sigma-Aldrich). Protein samples were diluted at either 0.8 wt% or 0.5 wt% in DW, then filtered with a 0.22 μm filter prior to analysis and 50 μL were injected to the HPLC system by means of a Waters 717 autosampler. Chromatograms were recorded and processed by the Waters Empower PDA software (Version 3).

2.7. Statistical Analysis

When necessary, analysis of variance was conducted by means of Bonferroni's test at the $p \leq 0.05$ level, using a standard statistical software. This procedure evidenced significance of results according to treatments applied on protein samples.

3. Results

3.1. DSC analysis

Thermal Stability. T_{onset} , T_{d} and ΔH_{d} of LPP-control (8 wt%) at pH 7.5 was examined at two heating rates, using DSC (**Table 1**). The T_{onset} and T_{d} values inform on temperature inducing protein unfolding and protein thermal stability, respectively. The enthalpy changes (ΔH_{d}) reflected the extent of ordered structure of the globulin as the transition from native state to denatured one took place (Tang, 2008). Thermograms displayed only one broad endothermic peak, corresponding to the overlapping denaturation of 7S and 11S globulin fractions of pea (Shand et al., 2007; Sun et al., 2010). At 10°C/min, thermal parameters of LPP-control were found in the same range than those mentioned elsewhere at pH 7, with no salt (**Table 1A**, first row); Shand et al. (2007) and Sun et al. (2010) measured for laboratory-prepared pea globulin isolates T_{d} and ΔH_{d} values of 84°C, 7.3 J/g and 86.2°C, 15.8 J/g_{protein}, respectively. For this present study, protein extraction using diluted (0.25-0.5 M) acid/alkali solutions was milder than in the study performed by Shand et al. (2007), while the acidic precipitation denatured more proteins than the salt extraction as used by Sun et al. (2010). Besides, such a partial protein denaturation would enhance their aggregation during heat-treatment (Choi & Ma, 2005). Rupture of hydrogen bonds was endothermic, but disruption of hydrophobic bonds and subsequent aggregation are both exothermic events (Sun et al., 2012).

Effect of NaCl. By addition of 100 mM NaCl, thermal stability of LPP raised significantly (**Table 1A**, first-second rows). Thus higher level of energy was needed to induce protein unfolding. The stabilizing effect of NaCl arise from the non-specific charge-shielding

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

effect between charged groups of proteins, thus reducing inter- and intra-chain repulsions (**Table 1A**, first-second rows) (Sun et al., 2010, 2012). NaCl could as well reinforce intramolecular hydrophobic interaction, thus promoting salting-out effect and aggregation (Choi et al., 2005).

According to Mession et al. (2012_b), thermal parameters of the LPP-NaCl sample were close to those measured for globulins obtained from dry pea seeds. As the isolate S85M batch originated from these latter ones, this result corroborated the extraction of LPP from the soluble fraction of the present commercial isolate (Mession et al., 2012_a).

Effect of Heating Rate. Without NaCl, slower heating rate at 5°C/min than at 10°C/min decreased both T_{onset} and T_d values ($\approx 4^\circ\text{C}$) for LPP-control, while ΔH_d values were not affected (**Table 1A-B**, first row). Sun et al. (2012) pointed out that reducing the heating rate from 4 to 1°C/min decreased T_d , while T_{onset} and ΔH_d values of pea globulins were not significantly different. It was concluded that temperature at which protein started to aggregate would be heating-rate dependent. Therefore the energy barrier to induce LPP unfolding prior to their aggregation would decrease with heating rate; more progressive protein unfolding (in time) would reduce in a same fashion their aggregation rate (Clark et al., 2001). Meanwhile, the lower thermal parameters values of LPP-control than those obtained by Sun et al. (2011) were indicative of the greater loss-of ordered structures before heat-treatment of the globulins studied in the present investigation. Thence LPP denaturation and aggregation would take place at decreasing temperature.

Effects of Protein Structure Perturbants. The addition of either NEM or DTT at 10 mM was evaluated on thermal stability of the LPP samples. While heating at 10°C/min, T_{onset} and T_d values of LPP+NEM decreased, while T_{onset} only decreased slightly for LPP+DTT (**Table 1A**, third and fourth rows). Here, NEM and DTT appeared to facilitate unfolding of LPP. Given that small changes of thermal parameters, such phenomenon would be in fact restricted. However thermal parameters of LPP+NEM and LPP+DTT were unaffected at 5°C/min (**Table 1B**, third and fourth rows second). Anyway the ΔH_d values were unaffected by the heating rate. From one hand, pea vicilin proteins are devoid of sulfur- amino acid (Rangel et al., 2003). On the other hand, S⁻/SS exchange reactions would concern exclusively legumin 11S containing sulfur-amino acids and disulfide bridges (Gatehouse et al., 1980; Shand et al., 2007). Marcone et al. (1998_a) indicated in fact that non-covalent bonds between

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

subunits stabilized legumin-like 11S proteins quaternary structure. Molecular rearrangements induced by heat-treatment within the oligomeric structure of legumin would be the prerequisite to allow exposure of free sulfhydryl groups (at a tertiary level of structure). Here, at a heating rate of 5°C/min, denaturation initiated at lower temperature and would concern firstly disruption of non-covalent interaction binding together subunits constitutive of LPP. At 10°C/min, the suggested simultaneous unfolding at several levels of protein structure would get closer in time denaturation and aggregation events, probably modifying slightly accessibility of both sulfhydryl and disulfide bonds.

In the present study, if S⁻/SS exchange reactions took place during heat-denaturation of LPP-control, unfolding should be sufficient to expose both sulfhydryl groups and disulfide bonds of legumin subunits. Regarding minor effect of NEM and DTT on LPP thermal parameters, legumin was apparently “diluted” with vicilin proteins. Furthermore, effects of NEM and DTT could be limited given that the compact structure of legumin, hard to unfold¹⁵. As emphasized by DSC measurements, thermal properties of 11S pea legumin and 7S vicilin-like protein were not affected by addition of NEM, and NEM or DTT, respectively (Tang, 2008; Meng et al., 2001). To summarize, S⁻/SS exchange reactions would play a minor role during heat-denaturation of pea globulins.

No more endothermic peak was detected by re-heating the LPP samples, meaning that complete denaturation was achieved for both heating rates. It was also the case for the APP samples.

Table 1

Thermal parameters of globular pea proteins (LPP, 8 wt%) at pH 7.5 and effect of some protein structure perturbants^a. Two heating rates were examined: (a) 10°C/min; (b): 5°C/min.

Table 1a

Samples	T _{onset} (°C) ^b	T _d (°C) ^c	ΔH _d (J/g _{protein}) ^d
LPP-control	70.5±0.1 a	82.4±0 a	9.5±0.25 a
LPP-NaCl ^e	77.2±0.2 b	87.5±0.7 b	13.9±0.4 b
LPP + NEM ^f	68.3±0.5 c	80.3±0.2 c	10.6±1.1 a
LPP + DTT ^g	68.7±0.2 c	82.1±0.1 a	7.7±1.4 a

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Table 1b

Samples	T _{onset} (°C)	T _d (°C)	ΔH _d (J/g _{protein})
LPP-control	67.1±0.2 a	78.5±0.2 a	9.2±1.2 a
LPP-NaCl ^e	ND ^h	ND	ND
LPP + NEM	66.2±0.4 a	78.0±0 a	10.1±0.7 a
LPP + DTT	66.6±0 a	79±0 a	9.4±0.1 a

^a All data were given as mean ± SD of triplicate measurements. Means in a column bearing the same letter are not significantly different ($p \geq 0.05$). ^b Onset temperature. ^c Temperature of denaturation. ^d Enthalpy of denaturation. ^e in 100 mM NaCl. ^f LPP with NEM (at 10 mM). ^g LPP with DTT (at 10 mM). ^h Not determined.

3.2. Dermination of Free Sulfhydryl Content

Free sulfhydryl of protein sample before and after heat-treatment were evaluated (**Table 2**). GDNHCl was used to break non-covalent bonds stabilizing protein structure (Sun et al., 2012). Extensive dialysis of samples removed excess or un-reacted NEM or DTT prior to Ellman's titration. Given that no different values between LPP-control and LPP+NEM samples, sulfhydryl groups would be inaccessible before heat-treatment of pea globulins, for legumin 11S especially (Shand et al., 2007); NEM was ineffective to block any sulfhydryl group of LPP.

Since pea globulins exhibited poor free sulfhydryl groups contents low number/possibilities of S⁻/SS exchange reaction during heat-denaturation were expected (O'Kane et al., 2005). Surprisingly, heating LPP increased apparently exposure of free sulfhydryl groups, even higher for APP+NEM than APP-control. This tendency contradicted the results emphasized by Tang, Chen, & Ma (2009) on vicilin 7S globulins from *Phaseolus angularis*, exhibiting various S⁻/SS bonds contents. In the present study, higher number of sulfhydryl groups in both APP-control and APP+NEM samples could reflect disruption of more disulfide bonds within LPP than newly-formed during APP formation. From LPP to APP-control, thermally-induced conformational changes were suggested to open stiff local bends of polypeptide chains, where a few sulfhydryl groups could be initially located. A newly-formed disulfide bond could release one another sulfhydryl group previously involved in the broken disulfide bond, possibly more accessible than the first (free) sulfhydryl group. Thereafter aggregation of unfolded protein chains would be predominantly governed by non-covalent bonding. In fact, Ellman's reagent displayed higher reactivity for the APP-control than that for the LPP-control sample; adding GDNHCL was found to break more easily

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

aggregated forms of pea globulins than (quasi-) native ones, leading apparently to higher content of free sulfhydryl groups in the case of the aggregates.

Table 2

Free Sulfhydryl Contents in samples containing Low-Denatured Globular Pea Proteins (LPP) and Thermal Aggregates (APP).

Sample	Free sulfhydryl groups ($\mu\text{g S/g}_{\text{protein}}$) ^a
LPP-control	2.1 \pm 0.1 a
LPP + NEM ^b	2.0 \pm 0.0 a
LPP + DTT ^c	13.3 \pm 2.4 b
APP-control	2.9 \pm 0.1 c
APP + NEM	3.5 \pm 1.1 c
APP + DTT	13.3 \pm 1.3 b

^a Determined at pH 7.5 according to Ellman's titration, using ϵ (412 nm) = 13250 M⁻¹. cm⁻¹ for DTNB. All data were given as mean \pm SD of triplicate measurements. Means bearing the same letter (a-c) were not significantly different ($p > 0.05$). ^b LPP and related APP samples prepared with NEM (at 10 mM). ^c LPP and related APP samples prepared with DTT (at 10 mM).

From LPP+NEM to related APP form, the situation would be more complex. During heat-denaturation, a competitive kinetics between the NEM-blocking effect on sulfhydryl groups while globulins unfolded and subsequent protein aggregation was hypothesized. When initially buried sulfhydryl groups were exposed during heat denaturation, NEM would inhibit partially S⁻/SS exchange reactions, leading to enhanced polypeptide segments flexibility (O' Kane et al., 2005) Such a phenomenon would favor interaction via non-specific interaction between unfolded LPP, increasing probably aggregation rate. Thereby NEM would be rapidly ineffective to block just-accessible free sulfhydryl groups, since unfolded polypeptide chain aggregated quickly via hydrophobic interaction.

The free sulfhydryl contents for LPP+DTT and APP+DTT samples were \approx 4-fold higher than in other samples. Sulfhydryl groups involved in disulfide bonds within legumin subunits were reduced by DTT, allowing their titration by Ellman's reagent. The free sulfhydryl contents for LPP+DTT and APP+DTT samples were the same, meaning that no newly-formed disulfide bond were established during thermal aggregation. An amount of DTT at 10 mM would allow complete reduction of disulfide bonds. Thence sulfur-containing amino acid appeared to be mainly involved into disulfide bond between L α and L β legumin

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

polypeptides (O' Kane et al. 2004_c). Thereby the amount of disulfide bounds for LPP in this study would be in the range $\approx 10 \mu\text{M}$ equivalent $\text{S}^-/\text{gprotein}$.

3.3. Electrophoretic Patterns of LPP-control, LPP+NEM, LPP+DTT and Related APP Samples Under Denaturing (SDS) and Denaturing/reducing (with SDS+DTT) Conditions

More efficient than classical denaturing agents (urea, GDNHCL), SDS at a few tens of millimolar concentration binds strongly to protein and unfolds its structure by increasing net negative charge between polypeptide segments (Choi et al. ,2005).

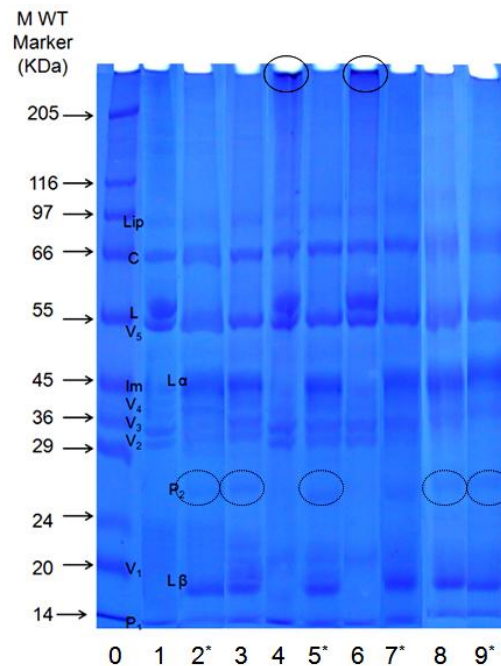


Figure 1: Electrophoretic patterns (continuous SDS-PAGE, 10%) of low-denatured globular pea proteins (LPP) and related thermal aggregates (APP), in presence or not of protein structure perturbants. Samples bearing the superscript * were pre-treated with SDS+DTT reagents (reducing conditions, for both reagents 10%, m/v), otherwise they were prepared in deionized water^a. Lane 0: Molecular weight (Mw) markers, lanes 1-2*: LPP-control, lane 3: LPP+DTT^b, lane 4-5*: APP-control, lane 6-7*: APP+NEM^c; lanes 8-9*: APP+DTT.

^a In the lanes, P₁₋₂: bands of pea albumins PA₁₋₂ or small vicilin fragments; V₁₋₅: bands attributed to vicilin 7S subunits; Im: impurity; L: legumin 11S subunit, L_α and L_β: acidic and basic polypeptides of legumin, respectively, C: convicilin, Lip: lipoxygenase. Solid and dotted circles indicated bands corresponding to high-Mw aggregates (>200 kDa) produced by heat-treatment and pea albumins, respectively. ^b LPP and related APP samples prepared with

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

dithiothreitol (DTT at 10 mM). ^c APP samples prepared with N-ethylmaleimide (NEM at 10 mM).

Pea Globulins Heterogeneity. Electrophoretic pattern LPP exhibited numerous bands (Figure 1, **Lane 1**). The band **P**₁ at < 14 kDa could be attributed to small traces of pea albumins (PA1) or small vicilin fragments β (13 kDa), γ (12-16 kDa) or β : γ (Tzitzikas et al., 2006; Gatehouse et al., 1982). Polypeptides **V**₁-**V**₄ in the range 20-36 kDa could correspond to the fragments α (20 kDa), α : β (30-36 kDa) and β : γ (25-30 kDa), while **V**₅ was the main subunit α : β : γ (52 kDa). The band **P**₂ at \approx 26 kDa appearing under reducing conditions may be a contaminant (**Lane 2**^{*}). An extra polypeptide at \approx 89 kDa was probably lipoxygenase **Lip** (Shand et al., 2007). The strong band at \approx 56 kDa was attributed to legumin L subunits, which disrupted under reducing conditions into acidic L $_{\alpha}$ (38-40 kDa) and basic L $_{\beta}$ (20-22 kDa) polypeptides linked via disulfide bond (**Lane 2**^{*}). An impurity **Im** at \approx 40 kDa coincided with the polypeptide L $_{\alpha}$ under reducing conditions. This could be unprocessed-legumin subunits, which were not associated *in vivo* with L $_{\beta}$ (Gatehouse et al., 1980; Marcone et al., 1998_a). For the LPP+DTT sample, the disulfide bonds between the polypeptides L $_{\alpha}$ and L $_{\beta}$ were reduced (**Lane 3**). Moreover, a densitometric analysis performed on triplicated lanes indicated the following composition, as percentages of the total polypeptide bands: **P**₁: 9.4 \pm 1.6%; **V**₁: 1.9 \pm 0.4%; **V**₂-**V**₄: 15.2 \pm 2.3%, **Im** 5.4 \pm 0.6%; **V**₅: 16.0 \pm 1.4%; legumin **L**: 39.6 \pm 3.3%; **C**: 9.9 \pm 1.2%; **Lip**: 2.7 \pm 0.9%. Proportions were close to that found previously for globulins extracted from pea seeds (Mession et al., 2012_b – **P2**).

Effect of Heat-denaturation on Electrophoretic Pattern. The dark trails along the lanes were significant of denatured proteins which penetrated hardly the electrophoresis gel, as mentioned elsewhere for soy protein thermal aggregates (Li, Li, Hua, Qiu, Yang, & Cui, (2007) (**Lanes 4** and **6**) Besides, diffusive bands reflected minor changes within subunits, aggregating predominantly via non-covalent interactions, which were disrupted by SDS. Both APP-control and APP+NEM samples displayed a strong band at the bottom of well, attributed to large protein aggregates of Mw higher than 200 kDa, which did not enter the electrophoresis gel (indicated by solid circles on **Figure 1**). Thus NEM would not inhibit restricted S²/SS exchange reactions, since sulfur amino acid are usually deeply buried within the hydrophobic core of 11S-like globulins (Marcone et al., 1998_a; Choi et al., 2006).

In the following, the APP samples were mixed with different reagents which disrupted either physical and/or chemical interactions (**Lanes 5**^{*} and **7**^{*}, APP-control and APP+NEM

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

samples treated with SDS+DTT illustrated here). Electrophoretic patterns of samples diluted in DW and treated with either SDS or SDS+urea were apparently not different. The small amount of SDS brought by the electrophoresis sample buffer dissociated subunits constitutive of both LPP and APP. This evidenced weak interactions stabilizing LPP structure and allowing APP formation were, as subunits would re-associate non-specifically after heat-denaturation. When treated with SDS+DTT, the high-Mw aggregates band vanished; a few newly-formed disulfide bonds by heat-treatment were reduced (**Lanes 4, 5*** and **6, 7***). Those would involve rather legumin subunits, meanwhile minor changes of the band **L** indicated that legumin subunits were not disrupted to a large extent. **L_α** and **L_β** polypeptides would remain linked together.

While comparing LPP+DTT and related APP samples (**lanes 3 and 8-9***), **L_α** and **L_β** polypeptides remained dissociated before and after heat-treatment; DTT was in excess. Macroscopically, the APP+DTT solution was whitish with development of turbidity while heating. Small precipitates were collected by centrifugation, attributed to insoluble macro-aggregates. Following heat denaturation, complete denaturation of legumin was suggested to release **L_α** and **L_β** polypeptides, which subsequently over-aggregated. Thereby preservation of disulfide bonds would help to stabilize structural conformation of heat-induced aggregates of pea globulins.

Afterwards, the protein Mw evolution from LPP to APP samples were investigated by SEC-HPLC.

3.4. Effect of Heat-Treatment on Chromatographic Profiles at 215 nm of pea globulins (Figure 2)

Chromatograms of LPP and related APP samples were divided into five elution ranges (i-v) to distinguish the different protein fraction according to their Mw. The proportion of integrated area of each fraction was determined, considering their sum equal to 100% (**Table 3**). The APP+DTT sample was not injected; the solution could not be filtered properly because of rapid sealing due to large particles in suspension. A wavelength of 215 nm was chosen since the volume of the Superdex[®] column (24 mL) diluted protein samples and consequently the signal resolution at 280 nm was low.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

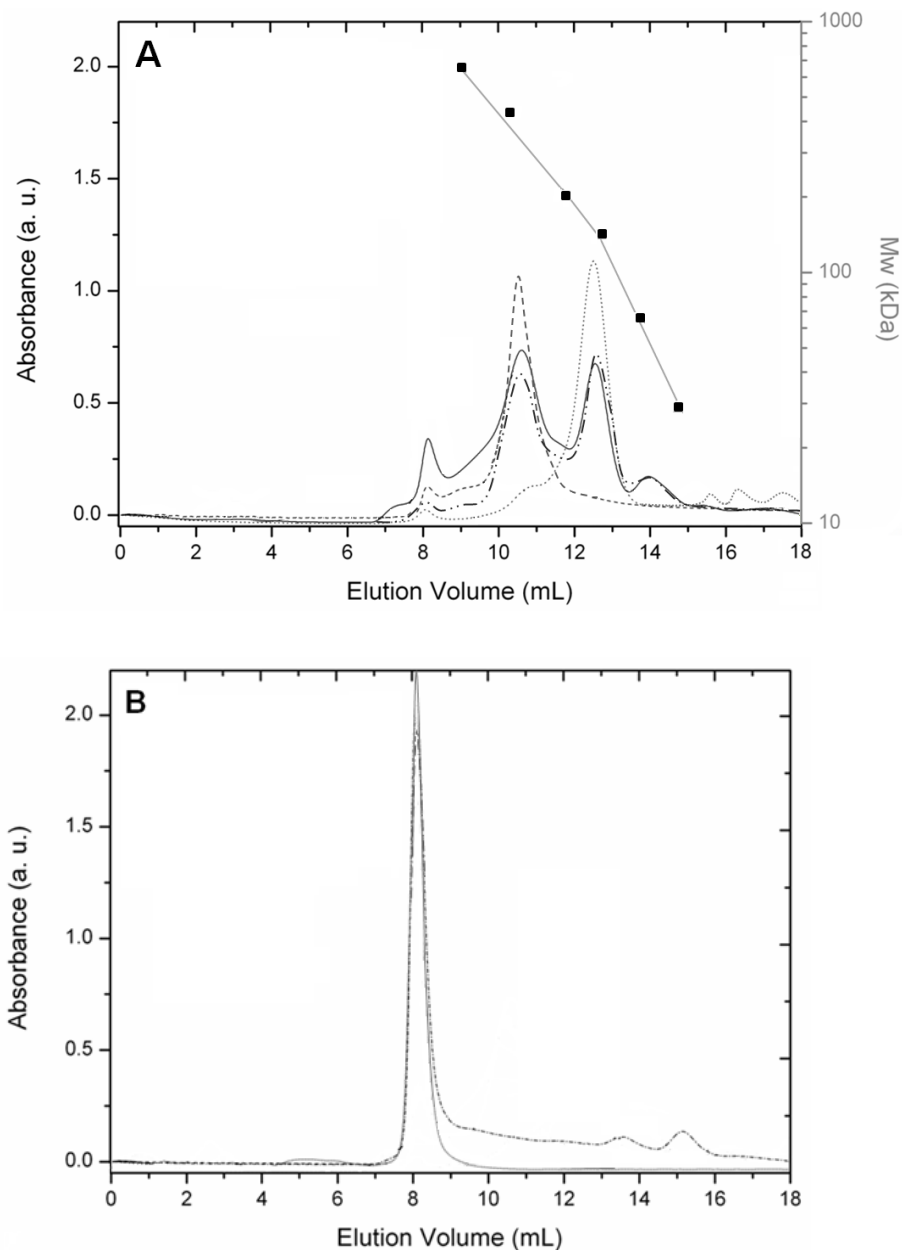


Figure 2: Elution profiles of low-denatured globular pea proteins (LPP) and related aggregates (APP) obtained with a Superdex[®] 200 10/300 GL column. The flow rate was 0.4 mL.min⁻¹. Absorbance of the eluent was monitored at 215 nm. Samples at 0.8 wt% were (A): LPP-control and LPP+DTT (gray solid and black dash-dot-dotted lines, respectively), also Legumin 11S and Vicilin 7S separated fractions (dark-gray dashed and light-gray dotted lines, respectively); (B) APP-control and APP+NEM (dark-gray dash-dotted and light-gray solid lines, respectively). The calibration curve of Mw standards (squares + thick solid line) was given on Figure 2A.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Table 3

Percentage of integrated area from SEC-HPLC chromatograms at 215 nm (from Figure 2), for low-denatured globular ea proteins (LPP) or related aggregated forms (APP) prepared in deionized water (0.8 wt%).

Elution volume (mL)	<8.7±0.1	8.7±0.1 - 9.1±0.1	9.1±0.1 - 11.2±0.3	11.2±0.3 - 12±0.1	12±0.1 - 13.6±0.4	>13.6±0.4
Mw ^b (kDa)	>>660	660 - 620	620 - 360	356 - 260	260 - 60	< 60
Protein fraction	i	i'	ii	iii	iv	v
Sample	Percentage of protein fraction (%)					
Leg ^b	5.1±1.9	13.8±3.2	78.7±5.3		2.08±1.2	0
Vic ^c	0	0	0	78.3±5.5		21.7±5.5
LPP-control (=LPP+NEM ^d)	4.1±0.96	7.6±2.3	33.2±4.2	11±2.7	28.1±5.9	15.3±1.5
LPP+DTT ^e	1.4±0.4	1.8±0.3	32.4±0.8	10.7±4	40±4.8	14.2±0.6
APP-control	66.7±1.28		18.7±3.1			14.7±3.3
APP+NEM	95.2±1.4		4.8±1.3			0
APP+DTT	ND ^f					

^a All data were given as mean ± SD, calculated on at least three chromatograms. The total integrated area from SEC-HPLC spectra (i+i'+ii+iii+iv+v) was defined as 100%. ^b Legumin-enriched fraction (≈80% purity). ^c Vicilin-enriched fraction (≈80%). ^d LPP and related APP samples prepared with NEM (at 10 mM). ^e LPP and related APP samples prepared with DTT. ^f Not determined.

Chromatographic Profile of Unheated LPP Samples (Figure 2A). The LPP-control sample exhibited two major peaks, which added integrated areas (fractions ii+iii+iv) were ≈72% (**Table 3**, third row). They were attributed to legumin 11S and vicilin/convicilin 7S, since they eluted at volumes corresponding to ≈410 and ≈170 kDa in the calibrated column. Minor peaks at ≈54, 30 and >30 kDa would correspond to smaller vicilin polypeptides, due to the *in vivo* proteolysis of the main vicilin polypeptide at ≈53 kDa (Rangel et al., 2003). Adding NEM did not modify elution profile of LPP, thus globulin structure was unaffected (Data not shown). Peak identification was checked by elution profiles of legumin 11S and vicilin 7S-enriched fractions, obtained and characterized by SDS-PAGE in a previous study (Mession et al., 2012_b – P2). Legumin and vicilin eluted in fact within fractions (ii+iii) and (iii+iv), respectively. Fraction (iii) was considered as an overlapping zone where both legumin and vicilin eluted. Purity of each separated globulin fraction was around ≈80%,

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

corroborating with densitometric analysis performed in the previous study mentioned above (**Table 3**, first row, fractions (ii+iii) for the legumin sample and second row, fractions (iii+iv) for the vicilin sample). Several groups evaluated the Mw of 11S and 7S pea globulins in the range ≈ 150 -200 and ≈ 330 -410 kDa, respectively (Rangel et al., 2003; Marcone et al., 1998_b). Such discrepancies of Mw were attributed to the great heterogeneity of subunits and shape of globulins encountered in the LPP sample (Ye, 2006). Probably interactions between the Superdex column matrix, containing cross-linked agarose-dextrane beads, and glycoproteins could alter protein retention time, and despite the column choice influenced by a previous study on pea vicilin (Rangel et al., 2003). To correlate with the electrophoretic pattern of the LPP-control sample above, hexameric legumin and both trimeric vicilin and convicilin Mw would be $6 \times 56 = 336$ kDa, $3 \times 52 = 156$ and $3 \times 65 = 205$ kDa, respectively. Those calculated values would match more likely with Mw of (native) pea globulins (Croy et al., 1980; Gatehouse et al., 1980, 1981).

A shouldered peak eluted early at ≈ 8.2 mL elution volume (**Figure 2A**), which integrated area was about $\approx 12\%$ (**Table 3**, third row, fractions i+i'). This could correspond to industrially-processed aggregates of high Mw, higher than 660 kDa in the calibrated column. In parallel, it was checked that isolate the laboratory-prepared by from pea seeds by Mession et al. (2012_b – **P2**) displayed as well this “early” peak, but of lower intensity than that of LPP-control. Marcone et al. (1998_a) notified that such a peak approaching the void volume of the column was typical of plant globulins. Unidentified large-sized material responsible of turbidity in solution would elute here, also polymerized proteins which subunits would be similar to those of 11S globulin. According to Gatehouse et al. (1980), it may be polymerized forms of 12S legumin. The legumin-enriched sample exhibited as well this “early” peak stretching to the main 11S peak, of higher protein fraction (i+i') than the LPP-control sample ($\approx 20\%$, **Table 3**, first and third rows). Furthermore, it was worth noting that the integrated area of this “early” peak decreased of about 3-fold by comparison with the LPP -control sample, while the fraction (ii) of intact legumin was apparently unaffected (**Table 3**, fourth row).—Possibly polymerized legumin was formed by disulfide bonds, as reduced by DTT, while the fraction (ii) of intact legumin was apparently unaffected. Since no small protein material was detected at high elution volume, non-covalent interaction between legumin subunits at a quaternary level would prevent release of dissociated L_α and L_β polypeptides.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Chromatographic Profiles of APP Samples (Figure 2B). A straight peak eluting at more than ≈ 660 kDa was noticed on the APP-control and APP+NEM spectra, which total integrated area in both cases was slightly lower (90-95%) than that found on the LPP one. Practically all the protein thermal-aggregates produced were soluble. Adding NEM did not prevent unfolded globulins to aggregate. The aggregates-peak of both APP sample eluted between 7.8-9 mL volume, which maximum overlapped with the “early” peak on the LPP-control spectrum. As described for heat-denatured soy proteins, large thermal aggregates were produced from a high LPP concentration at 8 wt% (Li et al., 2007). Consequently the peak corresponding to APP would elute close to the void volume of the column, bearing in mind that its exclusion limit was 1250 kDa. The peak area (fractions i+i') corresponding to aggregates were about $\approx 67\%$ and $\approx 95\%$ of the total integrated area for the APP-control and APP+NEM spectra, respectively (**Table 3**, fifth and sixth rows, fractions i+i'). Most of native proteins were denatured and dissociated subunits re-associated into large aggregates. The APP-control spectrum displayed an extended shouldering (fractions ii+iii+iv), where previous legumin and vicilin peaks could not be resolved, indicating that parts of proteins were in an unfolded state, since the re-heating procedure by DSC analysis suggested that the APP samples did not contain remaining (quasi-) native proteins. Proteins eluting within fraction (v) did not contribute to aggregation, as its area was not affected by heat-treatment. Minor peaks at ≈ 65 and ≈ 30 kDa were attributed to thermally-dissociated subunits which did not aggregate, probably convicilin subunits for the former one. O’Kane et al. (2004_{a,b}) reported that the highly negatively charged N-extension of convicilin could disturb gelation of an enriched vicilin isolate. Moreover, a critical convicilin polypeptide content of $\approx 13\%$ within a pea globulins isolate was found by O’Kane et al. (2005) to decrease its gelling ability at pH 7.6 and low ionic strength, i. e. pronounced weakening of the protein network. Therefore in the present study, the convicilin content of $\approx 10\%$ could hinder protein aggregation.

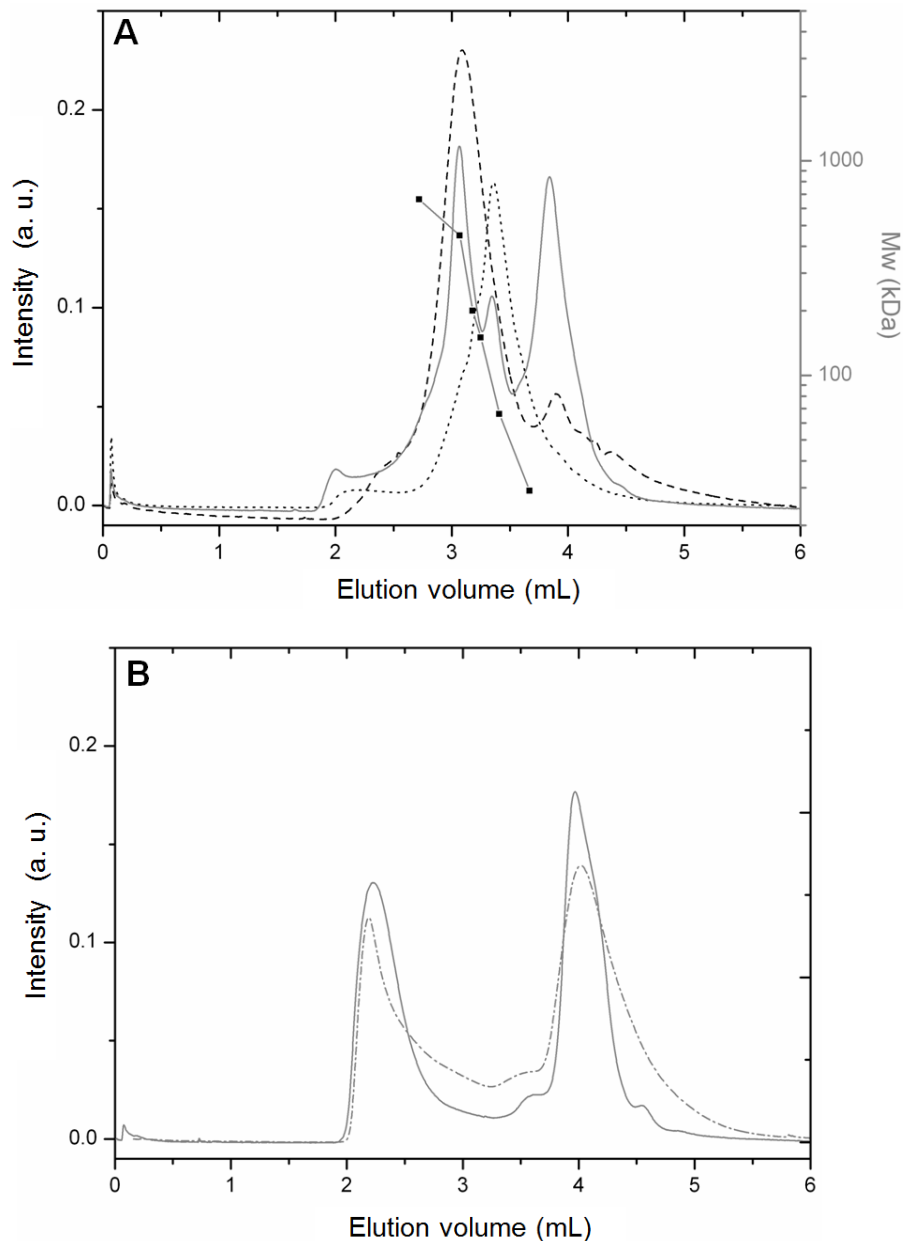
Now considering the APP+NEM sample, the enhanced flexibility of unfolded proteins in the presence of NEM would increase aggregation of subunits which re-associated in-between; this was reflected by both lower summed areas of fractions (ii-iv) and greater aggregates-peak intensity for the APP+NEM sample, than that calculated for APP-control (**Table 3**, fifth and sixth rows). NEM would promote macro-aggregates formation, even precipitation of heat-denatured 11S globulin from buckwheat (Choi et al., 2006). While heating LPP in the presence of NEM, possibly this one favored hydrophobic residue exposure

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

and increased aggregation rate of legumin via non-specific interaction. Moreover, the summed area of fractions (ii+iii+iv) was about 4-fold higher for the APP-control sample than that for APP+NEM. This could denote in the latter case an increased number of thermally-dissociated subunits involved into the aggregation phenomenon.

Re-evaluation of aggregated proteins Mw. Chromatographic profiles were re-performed at 280 nm using a Discovery[®] column with a larger exclusion limit (5×10^3 kDa) than previously (Spectra shown on Additional *Figure 3 - ne figure pas dans le present article*). A late peak where eluted small components of Mw lower than 30 kDa (*add. Figure 4, fraction (III)*) displayed strong UV absorption, while its area was slightly affected from LPP to APP samples (*Additional Table 4*). This was absent of the vicilin and legumin-enriched fractions spectra; probably small-sized material such as glycosylated fragments of vicilin 7S or non proteanaceous material eluted here, which did not aggregate thermally (Marcone et al., 1998_a). Moreover, an early peak was noticed for both LPP-control and Leg samples, where could elute large-sized material (*Figure 3A; Table 4*, first and third rows, fraction I). *The peaks attributed to legumin and vicilin fractions overlapped markedly because of lower separation efficiency for the Supelco[®] column in the range 200-66 kDa (fraction II)*. This did not allow here accurate measurement of legumin/vicilin composition. The re-evaluated mean Mw of legumin and vicilin fractions were ≈ 430 and ≈ 220 kDa, respectively; lower accuracy was expected with a column of wider exclusion limits (Ye, 2006). The aggregates-peak for each APP-control and APP+NEM sample was broad, with estimated Mw in a range of ≈ 1450 -600 kDa and ≈ 1450 -800 kDa, respectively, while peak maximum eluted at ≈ 1100 kDa in both cases (*add. Figure 3B*). *For APP-control, large aggregates of Mw ≈ 1450 -800 kDa would be produced in majority, coexisting with an intermediate fraction of aggregates in the range of ≈ 850 -600 kDa. There was in fact two sub-fractions of aggregates, eluting in the range ≈ 1.9 -2.5 and ≈ 2.5 -3 mL, representing respectively ≈ 70 and $\approx 30\%$ of the integrated peak area eluting from 1.9 to 3 mL. In this case it was noted a slight increase of fraction (III), attributed to thermally-dissociated subunits.* Therefore aggregates eluted within the exclusion peak encountered by the Superdex[®] column.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid



Additional Fig. 3: Elution profile of low-denatured globular pea proteins (LPP) and related aggregates (APP) obtained with a Discovery[®] GFC 500 column. The flow rate was 0.15 mL/min. Absorbance of the eluent was monitored at 280 nm. Samples in deionized water at 0.8 wt% were (A) LPP-control (gray solid line), legumin 11S fraction (dash dark-gray line) and vicilin 7S fraction (dotted black line); (B): APP-control and APP+NEM (dash dotted black line and light-gray solid line, respectively). The calibration curve with Mw standards was given on 3A (gray line+ black squares).

Additional Table 4

Percentage of integrated area from SEC-HPLC chromatograms at 280 nm (from add. Figure 3), for low-denatured globular pea proteins (LPP) and related aggregates (APP). Samples (0.8 wt%) were prepared in deionized water. Chromatograms were divided into three protein fractions (I-III), eluting at specified volume ranges^a.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Elution volume (mL)	1.9±0.1-2.7±0.1	2.7±0.1-3.6±0.1	>3.6±0.1
Mw ^b (kDa)	1450 - 700	700 - 29	< 29
Protein fraction	I	II	III
Sample	Percentage of protein fraction (%)		
Leg ^b	1.8±0.4	76.7±5	21.6±5.2
Vic ^c	0	76.9±1.3	23.1±1.3
LPP-control (=LPP+NEM ^d)	5.6±1	56.3±2.1	38.1±3.8
LPP+DTT ^e	ND ^f		
APP-control	35.8±2,6	18.9±4,4	45.3±1.3
APP+NEM	49.8±1.1	12.7±1,8	37.6±2.1
APP+DTT	ND		

^a All data were given as mean ± SD, calculated on at least three chromatograms. The total integrated area from SEC-HPLC spectrum (I+II+III) was defined as 100%. ^b Legumin-enriched fraction (≈80% purity). ^c Vicilin-enriched fraction (≈80%). ^d LPP and related APP samples prepared with NEM (at 10 mM). ^e LPP and related APP samples prepared with DTT. ^f Not determined.

Spectra evidenced that neither Mw nor aggregates-peak intensity of APP samples changed within one week. The aggregates produced in both APP-control and APP+NEM samples were stable to dilution from 8 wt% initially, as checked e. g. by injections at either 0.8 or 0.5 wt% protein concentration (Data not shown).

4. Discussion

A restricted involvement of S⁻/SS disulfide bonds exchange during heat-denaturation. First, thermal parameters of LPP were practically unaffected in presence of NEM or DTT. Moreover, the sulfhydryl contents were lower than those reported for several commercial pea protein isolates (O’Kane et al., 2005), and despite their lower legumin content than that for LPP in the present study. Free sulfhydryl groups were apparently too sparse and poorly accessible to allow to a large extent aggregation via chemical, specific bonding. The low rate/possibilities of S⁻/SS exchange reactions for pea globulins should be due to several factors, such as (i) legumin and cysteine contents variability from one pea cultivar to one another, (ii) reactivity of sulfhydryl groups depending on their relative position/exposure on the polypeptide chains, (iii) low reactivity of disulfide bonds deeply buried in the interior of the protein structure (Shand et al., 2007, Choi et al., 2006). Both SDS-PAGE and SEC-HPLC analysis emphasized thermal-unfolding and aggregation of LPP mainly via non-specific (physical) interaction, while S⁻/SS exchange reactions would play a

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

minor role (**Figure 1, lanes 6-8** and **Figure 2B**); adding small amounts of SDS disrupted the oligomeric structure of both low-denatured pea globulins and heat-induced aggregated forms.

NEM at either 10 or 20 mM (Data not shown) was partially ineffective towards sulfhydryl groups-blocking. The sulfhydryl groups were suggested to be located particularly in the neighborhood of disulfide bridges within legumin subunits; thus local covalent bonding deeply in the protein structure which unfolded thermally may not be excluded. As described for several plant globulins, the extent of aggregation depended on contents and exposure of hydrophobic residues of unfolding proteins, hypothesized to be enhanced in the presence of NEM. This corroborated with the narrower population of large aggregates for the APP+NEM sample than that for APP-control.

By adding DTT, aggregation of LPP was accompanied with salting-out effect, which was not encountered in the cases of LPP-control and LPP+NEM samples. DTT would break disulfide bonds between acidic L_{α} and basic L_{β} legumin polypeptides constitutive of legumin subunits, facilitating their unfolding. According to Marcone et al. (1998_b), the L_{β} polypeptide was particularly hydrophobic and buried in the core of legumin, while L_{α} was rather hydrophilic. By reducing disulfide bond between L_{α} : L_{β} , DTT would increase exposure of L_{β} polypeptides, promoting hydrophobic interaction during heat-treatment and precipitation of macro-aggregates. Adding DTT led as well to precipitation of vicilin 7S proteins from *Phaseolus angularis*, of uncommonly-high cysteine residue content (Tang et al., 2009).

Aggregation route of pea globulins. As protein unfolding was the prerequisite to allow aggregation, a slow heating at $\approx 4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (rather than heat-shock) would reduce the denaturation rate, promoting molecular rearrangements more likely in a linear fashion (Sun et al., 2011). Because of both high level of electrostatic repulsion at pH 7.5 between LPP species and low ionic strength; aggregation would occur when unfolded proteins had a specific orientation. However, owing to both high LPP concentration and incubation temperature of $\approx 11^{\circ}\text{C}$ higher than T_d protein thermal aggregation in a dense media (i. e. concentrated) would lead to large, amorphous aggregates rather than linear ones (Clark et al., 2001); the aggregation rate of globulins increased generally with heating temperature (Choi et al., 2006). Given that the wide M_w distribution of both APP-control and APP+NEM samples, dissociated subunits would re-associate randomly. The pea globulins subunits composition and charge heterogeneity, as well predominant physical interaction in-between unfolded

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

globulins would complicate greatly prediction of their aggregation route (O’Kane et al., 2009; Sun et al., 2012).

5.1.2.2. Comportement de phase et microstructure dans un système incompatible protéines de pois pré-agrégées - alginate

(Cette partie est directement liée à la précédente. Il s’agirait d’une ébauche d’article non achevée, néanmoins les principales données expérimentales ainsi que les explications probables (ou hypothèses apportées) aux phénomènes observés) y figurent. Certains résultats seraient à confirmer par reproduction des expériences, notamment pour ce qui concerne la partie 4.3 du présent manuscrit).

Phase behavior and microstructure in a pre-aggregated pea proteins-sodium alginate aqueous system

Abstract

Heat-induced protein aggregates were prepared at 8 wt% (quasi-) native pea globulins, as stated in our previous study above. Large thermal aggregates were obtained, displaying wide range of molecular weight around ≈ 1100 kDa. Thereafter those were mixed with an anionic polysaccharide - sodium alginate - and phase behavior was studied at 20°C. Mixtures at pH 7.2 and 0.1 M NaCl exhibited segregative phase separation. Meanwhile, phase diagram reflected for some initially-concentrated mixtures apparent gelation of the protein-enriched lower phase. Time evolution of microstructure was followed by confocal microscopy (CLSM). Image processing by Fourier 2-D transform brought out for several phase-separating mixtures a characteristic length scale Λ which grew slowly with time according to a power law; this was significant of a protein-continuous phase presenting a weak network-like structure with viscoelastic properties, confirmed by dynamic moduli (G' ; G'') measurements.

Keywords: Pea globulins, aggregation, alginate, phase separation, kinetics, microstructure, gelation.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

1. Introduction

Gelled biopolymer matrixes would help to construct new tailored, functional foods of high nutritive value. Some applications would concern development of hydrogels as vehicles for nutraceutical compounds, which release in specific environmental conditions (e. g. at the intestinal mucosa) may be greatly modulated (Maltais, Remondetto & Subirade, 2009). In such a way, multi-component gels would be more promising than single-component gels; for example, improvements of single-protein gels could be performed by adding polysaccharides (Turgeon & Beaulieu, 2001). Various microstructures correlated to the rheological properties of multi-component gels could be produced, originating from the limited co-solubility of protein and polysaccharide in admixtures (Tolstoguzov, 1995). In fact, aqueous mixtures made of protein - anionic polysaccharide generally exhibit phase separation ruled by thermodynamic incompatibility (Grinberg et Tolstoguzov, 1997; Sybe, Fernandes, Dannenberg, Bauer, & Klostermeyer, 1998; Tolstoguzov, 1995). When mixed together in a common solvent, interactions between dissimilar biopolymers interaction are of paramount importance for real systems formulation, since they affected greatly functionality of biopolymers taken individually, including gelling ability (Semenova & Savilova, 1998; Tolstoguzov, 1995).

Interaction between protein and anionic polysaccharide are repulsive at pH far from the protein isoelectric point and at sufficient ionic strength, to prevent inter-biopolymer complexes formation (Grinberg et al., 1997). Incompatibility was ascribed to more enthalpically favorable solvent-biopolymer interaction than inter-biopolymer interaction. The level of phase separation depended on intrinsic factors, i. e. nature, charge, conformational and structural features of dissimilar biopolymers in admixture. Higher differences of excluded volume for each biopolymer and not penetrable by the other were expected when solvent (extrinsic) parameters were selected to promote intensification of self-protein attraction, in the presence of a highly-charged (anionic) polysaccharide, particularly hydrophilic (Doublier et al., 2000; Grinberg et al., 1997). Given that incompatibility resulted in macroscopically phase-separating mixtures at the equilibrium, this would appear detrimental to foodstuff-like material aspect and quality, in terms of texture stability. One way to kinetically-entrap phase-separating microstructure could be gelation of the mixture, before complete demixing took place. Such a procedure would lead to macroscopically-stable products, while they were in fact in a microscopic unstable state (Butler et al., 2003; Norton et al., 2001). Therefore the

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

multicomponent gels produced could offer wider range of both versatile structure and textural properties than those obtained with single-component gels (Tolstoguzov, 1995).

Hence, with the aim to develop new food systems with sustainable protein source, an aqueous plant protein-anionic polysaccharide incompatible system was depicted in previous works (Mession et al., 2012_{a,b} – **P1** & **P2**). Emphasis concerned characterization of phase behavior at different scales of low-denatured pea globulins-alginate systems, according to natural protein heterogeneity and extraction/fractionation procedures. The phase diagrams established emphasized a better-resolved binodal line when a legumin-enriched fraction was mixed with alginate rather than non-fractionated pea globulins. Legumin of higher molecular weight (M_w) (≈ 330 kDa) within pea globulins was found to govern phase separation, while macroscopic phase separation did not occur for smaller vicilin/convicilin (≈ 150 - 180 kDa). By CLSM analysis, growth and subsequent coalescence of legumin-enriched droplets took place rapidly (≈ 30 min), compared to more diffuse aggregated-like microdomains of non-fractionated pea globulins-. By increasing biopolymer initial composition, stronger segregative effects gave rise to larger protein microdomains which got closer, coalesced and sedimented.

When large thermal-protein aggregates were used, incompatible protein-polysaccharide mixtures would phase separated at lower protein volume fraction than that observed with their native counterparts (Li, Cheng, Yi, Hua, Yang, & Cui, 2009). From native to aggregated form of soy globulins in admixture with κ -carrageenan, the authors noticed that microstructure presented enhanced connectivity of the protein-phase by increasing thermal-protein aggregates size. Thus designing protein aggregates of desired size before mixing them with a polysaccharide would be a pre-requisite for the development of novel systems, which cold-gelation could be triggered thereafter (Bryant & McClements, 1998; De Jong, Klok, & van de Velde, 2009). Beforehand, phase separation under non-gelling conditions was of primary interest; kinetics of demixing investigation should be taken into account so as to select microstructures of choice to kinetically-entrap them afterwards by gelation (Norton et al., 2001).

Keeping this in mind, this present study focused on phase separation of aggregated globular pea proteins - alginate system. Indeed alginate is a well-known anionic polysaccharide presenting gelling ability at room temperature, in the presence of added metal

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

ions (calcium cations) (Nussinovitch, 1996). First heat-induced pea protein aggregates were produced and characterized, as described previously (*part 5.1.2.1*). Then sodium alginate was added and mixtures at different initial biopolymer compositions were built at 20°C, pH 7.2 and 0.1 M NaCl. The solvent parameters were identical to those used in the studies performed by Mession et al. (2012_{a,b}). Microstructure evolution with time was followed with the support of Fourier 2D image analysis. To complete, viscoelastic properties of phase-separating mixtures were as well considered.

2. Kinetics of demixing

According to position of a mixture in the phase diagram of a specific system, phase separation was governed by either Nucleation and growth (NG) or Spinodal decomposition (SD) (**Figure 1**). Binodal line separated co-soluble domain of the incompatible one, which was further subdivided into two regions delimited by the spinodal line (Butler et al., 2003; Clark, 1995). Mixtures within the metastable region demixed via NG, when sufficient concentration fluctuation led to formation of a stable nucleus. Above or below a critical size, nucleus would grow in size slowly or re-dissolve, respectively. Far from the binodal, mixtures in the unstable region were rather bi-continuous. Free energy of mixing is always negative and demixing by SD was spontaneous. Both mechanisms distinguished morphologically-speaking. While demixing by NG produced a wide range of droplet sizes, irregularly spaced, more regularity within microstructure was characteristic of SD (Norton & Frith, 2001). By microscopy, phase-separating mixtures by SD displayed a characteristic length scale Λ , as the perpendicular distance to the liquid-liquid interfaces of the coexisting phases, which was found recurrent within the spinodal microstructure. During the early stage of phase separation, Λ remained constant. As intermediate and late stages of phase separation took place quickly, Λ evolved with time to higher values following a power law $\Lambda(t) \sim t^\alpha$. Different values of exponent α (≤ 1) were predicted while microstructure ripened during intermediate and late stages of phase separation, following either droplets coalescence or Ostwald ripening. Low values of α (< 0.33) were significant of gelation of one component. Thus, slowing down phase separation by either strong viscosity/thickening effects or gelation could produce a wide range of phase-separated morphologies in an unstable state (Butler et al., 2003).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

To investigate kinetics of phase-separation for mixtures particularly turbid, confocal microscopy and 2D-Fourier transform image analysis was a method of choice, since SALS was restricted to low-scattering mixtures (De Bont, Hendriks, van Kempen & Vreeker, 2004).

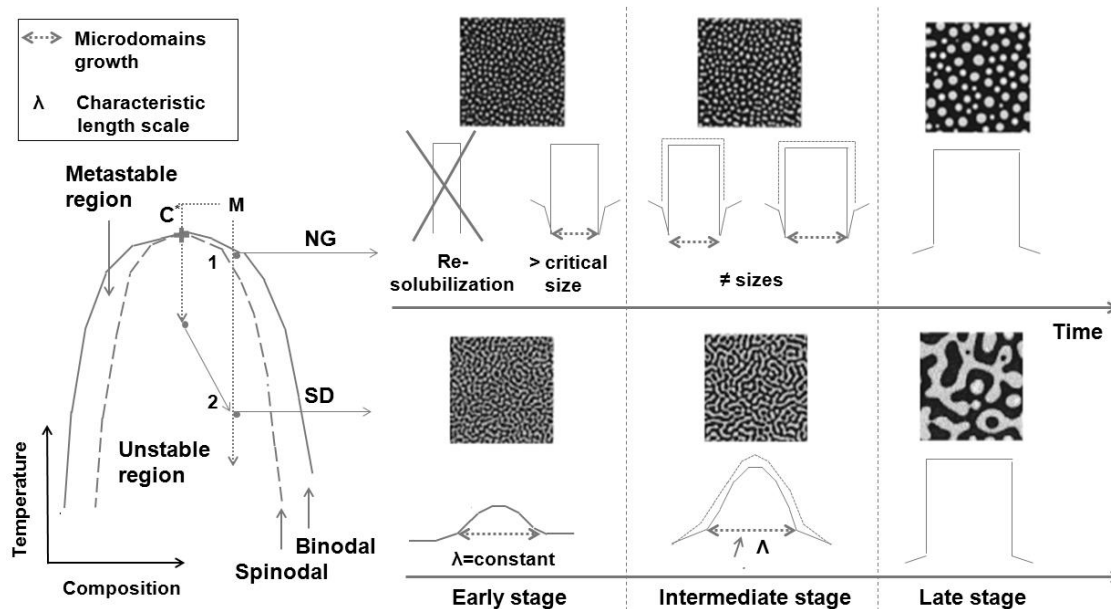


Figure 1: Schematic representation of phase-separating polymer mixtures with time by (1): spinodal decomposition (*SD*); (2): nucleation and growth (*NC*) (Butler et al., 2003 ; computerized simulations by Chen & Chakrabarti, 1998).

3. Materials and methods

3.1. Materials

3.1.1. Biopolymers

Sodium alginate (Alg) was used after purification and freeze-drying from commercial alginate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Low-denatured globular pea proteins isolate (PPI) were extracted from defatted Nutralys[®] S85M isolate (Roquette SA, Lestrem, France), as previously described (Mession et al., 2012_{a,b} – *P1* & *P2*). Ashes content (on a dry basis - d. b.) of purified alginate was 18.89 wt%, containing 3.4 mg calcium/g alginate, while its intrinsic viscosity $[\eta]$ at 20°C and in 0.1 M NaCl was 493 mL/g. PPI contained 92.5 wt% proteins and 7.36 wt% ashes (d. b.), with low turbidity and nitrogen solubility close to 100% at pH>7 (AOAC International, method 920.87, 1990).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

All other reagents and chemicals purchased from Sigma-Aldrich were on analytical grade.

3.1.2. Biopolymer stock solutions preparation

Freeze-dried Alg powder was suspended in water under gentle stirring until complete solubilization (≈ 2 h). PPI powder was suspended at 16 wt% in deionized water and stirred at room temperature until complete dissolution (≈ 2 h). The protein solution was subsequently desalted by extensive dialysis against water (protein solution-to-water 1:10, 4 changes for 24 h at 4°C). The pH was 7.4 ± 0.1 , while protein concentration was ≈ 10.5 wt%, finally adjusted to 8 wt%. This solution was named LPP, containing low-denatured globular pea proteins according to extraction procedure.

The LPP solution was poured in a large vessel hermetically sealed (head-space was at least twice the volume of the solution) and placed in a mineral oil bath equilibrated at 40°C. Then the solution was heated at 4.3 ± 0.2 °C/min from 40°C to 90°C, maintained at 90°C for 1 h, then cooled in ice for at least 2 h and stored at 4°C for a couple of hours. The solution containing aggregated pea proteins (APP) was centrifuged (12000g, 25 min, 25°C). No insoluble particles were evidenced by eye.

Alg₀ and APP₀ stock solutions were obtained by dialysis at 4°C, against a 0.1 M NaCl and 10 mM tris-HCl, pH 7.2 buffer (ratio biopolymer solutions-to-buffer of 1:20, 4 changes for 24 h at 4°C). After the dialysis step, Alg₀ and APP₀ concentrations were 3.2 wt% and 7.8 wt%, respectively, in accordance with chemical titrations (Mession et al., 2012_{a,b} – **PI** & **P2**).

3.2. Methods

3.2.1. Intrinsic viscosity measurements

LPP- and APP solutions were dialyzed in the same tris-buffer than APP₀. Such buffer was used to dilute protein solutions in the range 0.8 - 5 mg/ml. An Ubbelohde capillary viscometer (constant = 0.009844, Schott-Geräte, Germany) immersed in a water bath previously equilibrated at 20 ± 0.2 °C was used to measure viscosity of the diluted protein solutions. Intrinsic viscosity $[\eta]$, which is a measure of hydrodynamic volume occupied by a

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

mass unity of a molecule at infinite dilution, were obtained using Huggins and Kraemer double-extrapolation plot (Batista, Portugal, Sousa, Crespo, & Raymundo, 2005).

3.2.2. Phase diagram determination

Several APP - Alg mixtures were prepared by weighing and mixing together different amounts of APP₀ and Alg₀ in glass tubes. Mixtures were completed to 1 g by adding tris-dialysis buffer, then vigorously stirred for one minute with a vortex and left overnight. Phase diagram at 20°C, 0.1M NaCl, pH 7.2 and 20°C was established by centrifugation, visual observation and chemical titrations, as previously described for LPP – Alg-Na mixtures (Mession et al., 2012_{a,b}). Biopolymer composition of initial phase-separating mixtures were represented with related coexisting phases at the equilibrium, and bound by a tie line. The binodal was manually-fitted by joining directly tie-line ends.

3.2.3. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Microstructure of several APP - Alg mixtures was investigated using a confocal microscope TE-2000 Eclipse (Nikon), in fluorescence mode. The light source was a Ne-Ar beam laser.

APP were stained by adding 10 µL of an aqueous solution of rhodamine B isothiocyanate (RITC, 1 mg/mL) per mL of APP₀, stirred in dark for 1 h at 4°C. Excitation and emission wavelengths for APP-labeled were 543 nm and between 560 and 590 nm, respectively. It was checked that labeling did not modify significantly thermal properties of PP, nor phase behavior (data not shown). Just after stirring, 20 µL of each APP-labeled-Alg mixture were deposited between the slide and coverslip.

As fast as possible, time series of each sample were recorded at 20°C. Images were taken every 60 s for 30 min, with a width of 635.5 x 635.5 µm for a resolution of 512 x 512 (0.804 pixel/µm). Images were converted into gray scale (8-bit format). Background/noise and contrast corrections were applied to reduce artifacts from the optical equipment with Image J software (v. 1.45).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Image analysis consisted of 2D-Fourier transform, so as to detect any peculiar space frequency F (in μm^{-1}) within the microstructure of interest. The power spectra were radially averaged to 1D using Matlab software (The Mathworks, Inc., v.7.5.0.342). Appearance of a peak maximum of intensity f in the low-frequency range was related to a characteristic length scale Λ ($=1/f$), comparable to light scattering measurements (Butler et al., 2003; De Bont et al., 2004). Frequency f at the maximum peak intensity was determined graphically. Plot of Λ vs. time (min) were fitted according to power law $\Lambda(t) \sim t^\alpha$ relation.

3.2.4. Dynamic viscoelastic properties

The dynamic viscoelastic properties of some APP - Alg mixtures were obtained at 20°C using an SR-5 rheometer (Rheometric Scientific, NJ, USA) with plate-plate geometry (diameter 25 mm, gap 0.5 mm). The lower plate was connected to a peltier temperature controller. Storage modulus G' , loss modulus G'' (Pa) and $\tan \delta$ ($= G''/G'$) were recorded on the RSI Orchestrator Software (version 6.5.8). Immediately after mixture preparation, sample was loaded on the rheometer and dynamic measurements consisted of a time-sweep test at 1 rad/s frequency. All measurements were performed at imposed strain amplitude of 0.7 Pa within the linear viscoelastic region, as checked by stress-sweep tests from 0.3 to 10 Pa, at 1 rad/s.

4. Results and discussion

4.1. Capillary viscometry

Hydrodynamic volume of pea globulins before and after heat-treatment was determined by means of intrinsic viscosity $[\eta]$ at 20°C, pH 7.2 and 0.1 M NaCl. LPP and APP samples displayed $[\eta]$ values of 6.1 ± 0.5 and 14.8 ± 1.2 mL/g, respectively. Clearly, heat-treatment induced marked protein unfolding and subsequent aggregation, producing larger particles of higher space occupancy in solution (Batista et al., 2005). In the following, the effect of the heat-treatment applied on mean size of pea globulins was considered in terms of level of phase separation, with added alginate and in solvent conditions inducing incompatibility phenomenon, as depicted previously when (quasi-) native pea globulins were used (Messiou et al., 2012_{a,b}).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

4.2. Phase diagram

Phase behavior of the APP-Alg aqueous system at 20°C, 0.1 M NaCl, and pH 7.2 was investigated (**Figure 2**). It was added the phase diagram previously established with the (quasi-) native proteins LPP. At pH 7.2, both biopolymers were negatively charged, thus inhibiting associative interaction between dissimilar biopolymers (Grinberg et al., 1997). The NaCl concentration was selected so as to reduce the contribution of electrostatic forces within the interactions between APP and Alg (Semenova et al., 1998). Then excluded volume effects in terms of space occupancy in solution would be the main driving force, leading to segregation of each biopolymer in separated phases. Thereby the level of phase separation was directly correlated to differences in both size and conformation of APP and Alg.

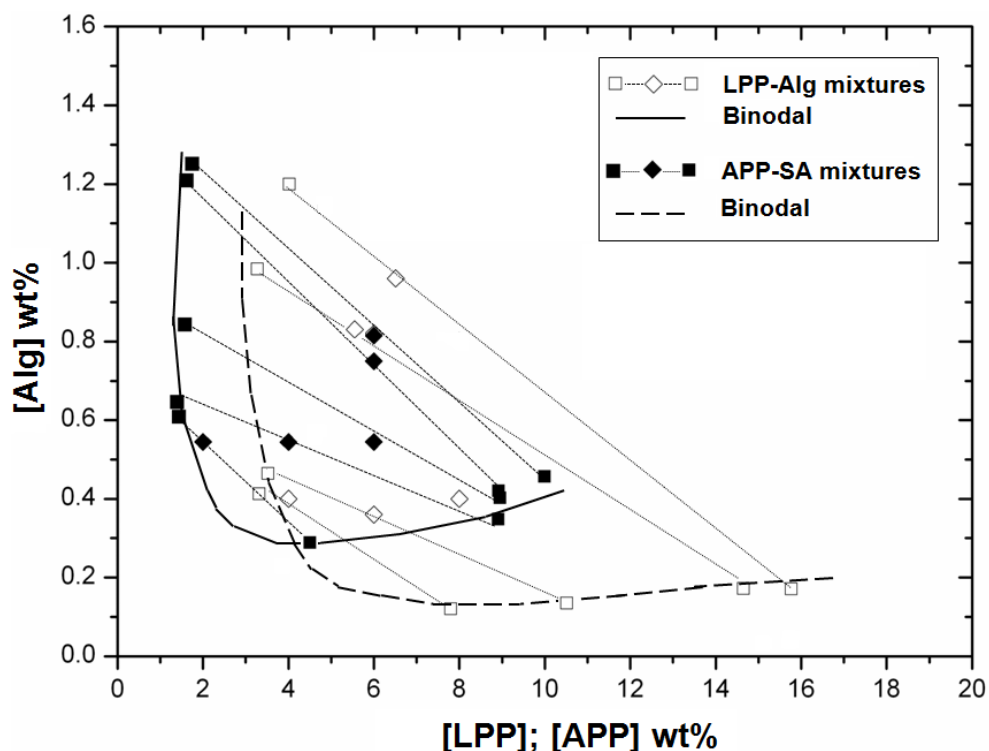


Figure 2: superposed phase diagrams at 20°C of low-denatured pea globulins (LPP) - alginate (Alg) (from Mession et al., 2012_b) and aggregated pea proteins (APP, from 8 wt% LPP) - Alg systems in 0.1 M NaCl, pH 7.2.

Most of mixtures were apparently incompatible as they macroscopically broke up into a clear upper Alg-enriched-phase and an opaque, lower APP-enriched phase. As noticed by protein titration, the upper phase of APP - Alg mixture was more depleted in proteins than that of LPP-Alg mixtures (Mession et al., 2012_a). Aggregated pea globulins displayed higher Mw and hydrodynamic volume than their native counterparts, thus occupying a higher

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

excluded volume for the polysaccharide (Li et al., 2008). Meanwhile, the APP - Alg mixtures studied here displayed higher levels of polysaccharide in the lower phase than those measured when LPP were used, using in both cases the same biopolymer initial compositions (Mession et al., 2012_a). Tie line ends on the APP - Alg system phase diagram converged apparently to a common point ($\approx 9-0.4$ wt%) on the lower branch of the binodal. This would reflect protein gelation of the lower phase, as APP concentrated so strongly that they could gel (Grinberg et al., 1997); this could lead to over-estimation of the polysaccharide concentration within the lower protein-phase. A part of the Alg-enriched microdomains could be entrapped in a gelled network-like protein structure of the lower phase. Thence, concentrated mixtures would not reach minimum of energy and phase separation could not be completely achieved in those cases (Butler et al., 2003).

In our previous study, quite similar phenomenon was encountered for initially highly-concentrated LPP-Alg mixtures (at more than 10-0.8 wt% initial composition). The enhanced viscosity of the whole incompatible mixture slowed down strongly the demixing process (Mession et al., 2012_a). In the present study, such disturbances would be more pronounced for some APP-Alg mixtures, occurring at lower initial protein concentration than that with LPP. Furthermore, it was noticed that the volume of the protein-enriched lower phase was higher for APP than LPP, when both LPP - Alg and APP - Alg mixtures had the same initial biopolymer concentration. Consequently, lower protein concentration when APP were used rather than LPP could be attributed to increasing amounts of solvent brought with Alg chains entrapped.

Higher level of incompatibility was suggested with large pre-aggregated protein particles, compared to their native counterparts of smaller size. Strong segregative effects were expected when high excluded volume effects were predominant (Grinberg et al., 1997). Meanwhile, viscosity of coexisting phases raised up as they enriched respectively, slowing down concentration fluctuations in the phase-separating mixture. Thence, macroscopic sedimentation of APP-enriched phase and creaming of the Alg-phase would be slowed down.

4.3. Microstructure: CLSM data and image analysis

Topological aspects. Microstructure elucidated by CLSM is illustrated on **Figure 3**. Single-APP₀ solution-labeled fluoresced uniformly; the microscope resolution did not permit to distinguish individual APP at a higher magnification (size $< 10 \mu\text{m}$, not shown). By adding

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Alg, bulk phase separation took place in all mixtures, in less than 1 min after end of stirring. Clear areas corresponded to APP-RITC-enriched microdomains, while black areas contained Alg.

For most of mixtures, the protein-phase displayed promptly faintly-interconnected protein microdomains, dispersing alginate inclusions. For the low concentrated mixtures A and C at 0.4 wt%, Alg, microdomains appeared more compact and individualized in a continuous Alg-enriched phase. Phase inversion from Alg-continuous to APP-continuous was clearly observed at lower protein concentration than that with LPP (Mession et al., 2012_b). This was as well correlated with shorter tie-lines on the APP - Alg phase diagram (**Figure 2**). Phase inversion from Alg-continuous to LPP-continuous was noted from ≈ 10 wt% LPP, while the APP-phase appeared continuous from 0.8 wt% Alg, whatever was the APP concentration. Therefore there would be a critical particle size of APP inducing macroscopic phase separation; this would decrease by leveling up the Alg concentration, because of higher space occupancy and thus solvent uptake in the polysaccharide phase. Such phenomenon was described elsewhere for pre-aggregated β -lactoglobulin - κ -carrageenan phase-separating mixtures (Croguennoc, Durand, & Nicolai, 2001). It was as well the case for pre-aggregated soy proteins- κ -carrageenan mixtures, which binodal lines of phase diagrams overlapped for both aggregated protein solutions, prepared at either 1 wt% or 5 wt% (Li et al., 2008). At a same initial biopolymer composition located between the rectilinear diameter (phase inversion point) and the higher branch of the binodal (where the polysaccharide phase should be continuous), microstructure data reflected that increasing size of protein particles led to denser protein microdomains which occupied larger volume fraction. There was the passage from isolated and diffuse microdomains to large ones, rather interconnected and forming rapidly a continuous phase.

At fixed Alg concentration (0.8 wt%), increasing protein concentration resulted in large and extended protein-enriched microdomains more tightly-connected (mixtures B, D, F). From an overview of micrographs, the fluorescence intensity of protein-microdomains was hypothesized to increase with stronger segregative effects; by moving away from the binodal. At fixed protein concentration (2-4 wt%), increasing alginate concentration resulted in enhanced connectivity between protein-microdomains, while protein phase volume fraction assimilated to fluorescent area surface coverage raised up from mixtures A to B and C to D to E. There was the passage from bi-continuous systems with diffuse protein microdomains at

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

low initial biopolymer composition (C) to a continuous protein-phase dispersing smaller and smaller inclusions of alginate. This was mentioned especially for the concentrated mixture E.

The protein-microdomains would be as well denser with time. It was observed that the microstructure of concentrated mixtures (e. g. 4-1.2 and 6-0.8 wt%) far from the binodal changed slightly from the 3-4 min following the end of stirring; coexisting phases ripening was particularly slow. Kinetics of demixing and afterwards sedimentation of the protein-enriched microdomains was clearly dependent on differences of density between coexisting phases, influencing viscosity of the overall mixture (Schorsch, Jones, & Norton, 1999). To compare, segregative effects for the (quasi-) native pea globulins - alginate mixtures (at concentrations below $\approx 8-0.8$ wt% gave rise to isolated and irregular aggregated-like protein microdomains. Those ripened slowly, as predicted when interface between immiscible phases was particularly wide and inter-space width between microdomains large (Butler et al., 2003).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

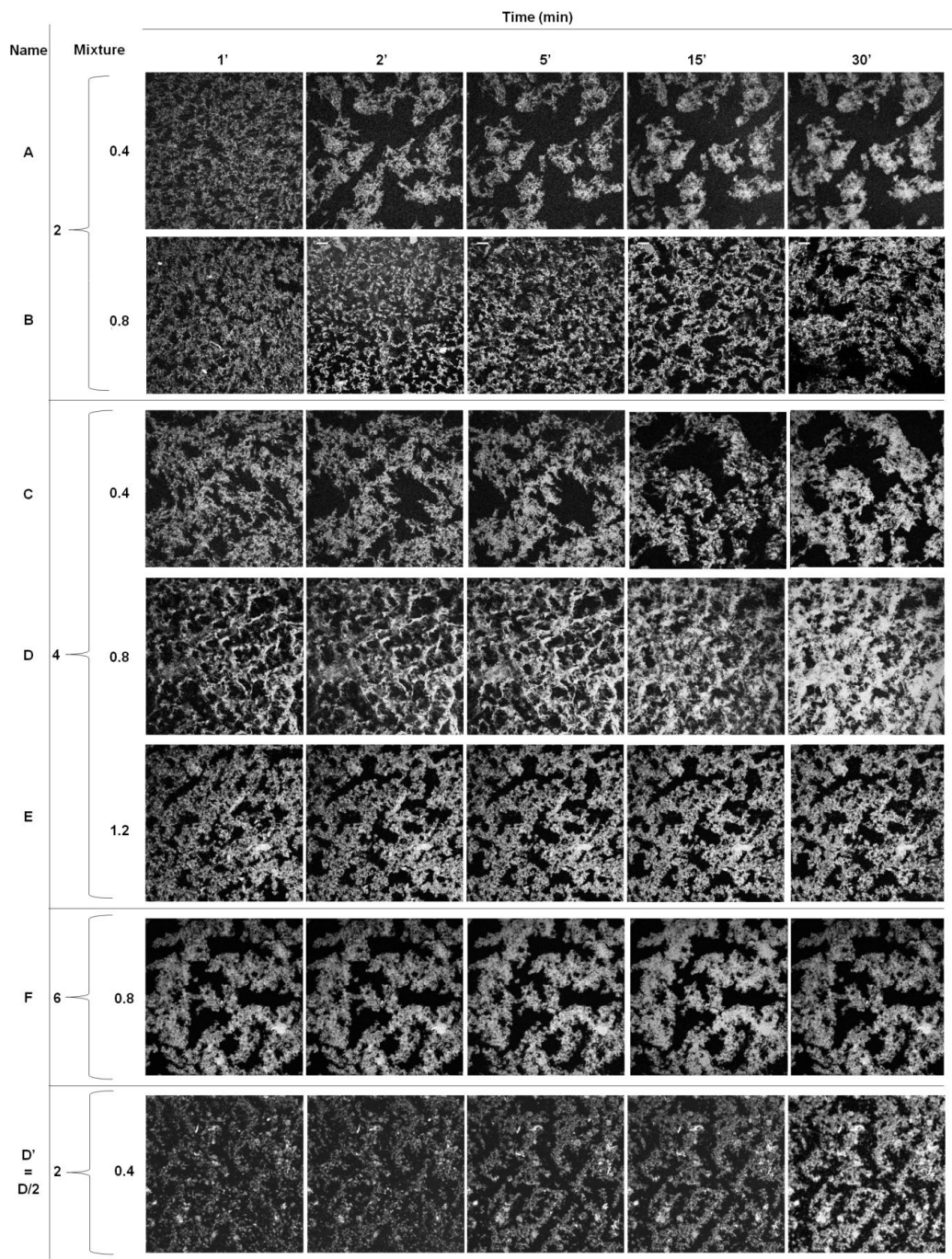


Figure 3: Time-series of CLSM micrographs of several pre-aggregated proteins (APP) - alginate (Alg) mixtures at 20°C. Biopolymer composition is given in APP-Alg wt%. Proteins appeared in clear. Images presented were taken at times indicated, after stirring was stopped. Image width is 636.5 x 636.5 μm .

Morphologically, the protein-enriched microdomains displayed an aggregated-like structure. The passage from diffuse protein-microdomains to denser ones would help to increase demixing rate, as it would follow the Stokes law (Schorsch et al., 1999). With time, subsistence of irregular and diffuse surface of protein-microdomains would denote the slow

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

decrease of surface contact between immiscible phases (Butler et al., 2003). As they did not fuse, the protein-microdomains were rather solid than in a liquid state, thus slow ripening of coexisting phases was strongly hypothesized. However, thermodynamic incompatibility ruled separation between two well-defined liquid phases, where microdomains coalesced during the late stages of phase separation (Grinberg et al., 1997; Schorsch et al., 1999). Here, the whole protein-phase was granular. Thereby, the loss of conformational entropy for alginate chains in the neighborhood of large colloid-like protein particles was hypothesized to result in depletion effects. The alginate chains were excluded from the interspace between protein particles which attracted to each other and then flocculated into an extended colloid-network of high volume fraction. (Li et al., 2008; Syrbe et al., 1998). Such a non-specific phenomenon could be additional to thermodynamic incompatibility. Excluded volume effects would be on the other hand predominant for dissimilar biopolymers in structure, as it was the case here. (Grinberg et al., 1997).

To check reversibility of the suggested depletion interaction, the mixture D was diluted two-fold after 24h ageing and re-stirring (Li et al., 2008). The resulting microstructure of mixture D' evidenced disruption of the protein network observed in D. Meanwhile D' displayed another microstructure evolution with time than A, even if mixtures had finally the same biopolymer composition. This could traduce that APP-clusters (<10 μm) were probably constitutive elements of the APP-microdomains at a larger scale of observation, which could be persistent after ageing. Segregative effects brought together individual APP, which subsequently enriched in a separated phase. Stability of APP-clusters with time could traduce strengthening of attractive interaction between pre-aggregated proteins. Besides, attraction leading to flocculation of clusters appeared weak. Hence, the protein structure would be modified slightly in highly-concentrated media, promoting surely additional physical bonds in-between aggregates (Li et al., 2008).

Time evolution of microstructure: Fourier 2D-transform was operated on time-series micrographs, to detect any characteristic length scale Λ within the microstructure. Mixtures A and C (close to the binodal) displayed polydisperse protein enriched-microdomains, where no peculiar Λ was detected (**Table 2**). Those were probably in the metastable region.

For concentrated mixtures, ripening rate of the APP-microdomains depended on the mixture position within the phase diagram. Excepted mixtures A and C, radially-averaged

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

space-frequency spectra displayed a peak of maximal intensity, moving slightly with time to lower space frequencies f . The evolution of length scale Λ as a function of time is presented on **Figure 4**. It was checked that Λ profile could be fitted by the power law $\Lambda(t) \sim t^\alpha$, with a reasonable correlation coefficient. It could be argued that wall effects between slide and coverslip could affect growth of microdomains (De Bont et al., 2004). In a previous study, the same image analysis was applied on mixtures of legumin - alginate. In this case, mixtures showed liquid-liquid phase separation and thereafter ripening/coalescence of legumin-enriched droplets occurred within ≈ 40 min after end of stirring; Λ measurements were found reproducible and the procedure validated (Mession et al., 2012_b).

Thus demixing rate was predominantly affected by the physical state of coexisting phases rather than experimental settings. The irregular aggregated shape of the protein enriched-phase was the main reason of slow phase separation. For the pre-aggregated proteins - alginate mixtures investigated here, calculated α exponent values were generally in the range 0.1-0.2. This was below 0.33, significant of particularly slow ripening in the late stages of phase separation, where one component could gel and decreased components mobility within the mixture (Butler et al., 2003). For the most concentrated mixtures E and F, very low α exponent could traduce cross-links within interpenetrated structures, typical of a gelled-like network quite stable with time. Such a behavior was observed elsewhere and concerned concentrated mixtures of casein and amylopectin (De Bont et al., 2004). At low initial protein concentration, mixture B presented the highest α exponent; ripening would be accelerated by hydrodynamic flow effects. While demixing reached very late stages of phase separation (≈ 2 h after mixture preparation in most cases), creaming/sedimentation of coexisting phases blurred observations for reasons of their high density differences.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

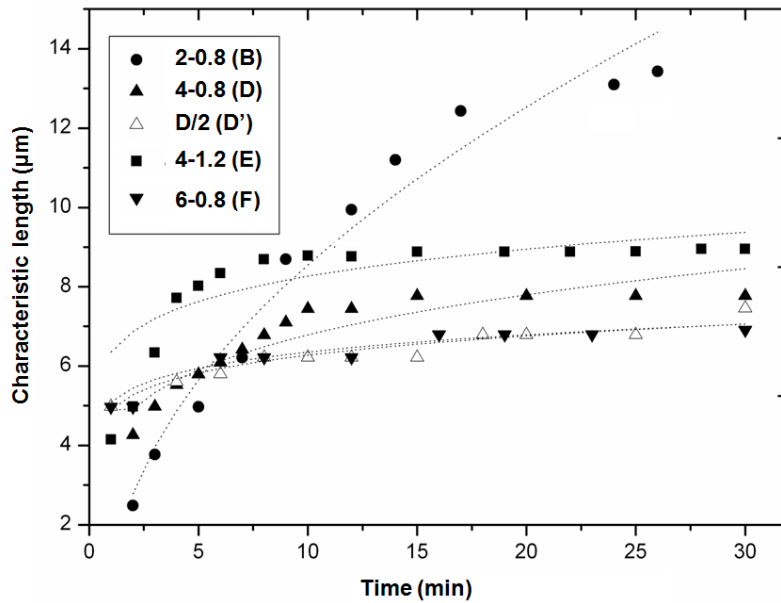


Figure 4: Characteristic length scale Λ and maximum of intensity as a function of time, determined from 2D-Fourier transform of micrographs for APP-Alg mixtures 4-0.4; 0.8 and 0.12wt%.

Table 2

Estimation of α power law exponent from time-resolved radial-averaged Fourier 2D-transform of CLSM micrographs

Mixture name ^a	APP-Alg wt%	α^b	R^{2c}
A	2-0.4	ND ^d	-
B	2.08	0.51	0.94 ^b
C	4-0.4	ND	-
D	4-0.8	0.17	0.93
E	4-1.2	0.11	0.97
F	6-0.8	0.06	0.96
D ^e =D/2 ^c	2-0.4 ^b	0.11	0.93

^a Mixtures are designed by letters, as stated on **Figure 3**. ^b Exponent α was determined according to fitting of experimental data with the equation $\Lambda(t) \sim t^\alpha$, Λ was the characterized length scale measured within the microstructure. ^c Correlation coefficient. ^d not determined; no peculiar characteristic length scale evidenced. ^e The mixture D' was made by diluting two-fold mixture D after ageing at 20°C for 24 h and subsequent remixing

Experimentally, it was difficult to distinguish NG and SD mechanisms, since demixing could occur similarly in the late stages of phase separation. Position of the spinodal relative to the binodal was as well hard to estimate; one reason could be the size heterogeneity of biopolymers (Norton et al., 2001). To state definitely on SD mechanism, Λ should be found constant in the early stage of phase separation (usually in less than 1-2 min after end of

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

stirring), however this was out of the experimental window because of sample preparation procedure.

4.4. Small-deformation rheology

Time-evolution of viscoelastic properties for mixtures D, E and F were considered. (**Figure 5**, mixture D not shown). To evidence any gelation of mixtures E and F slowing down infinitely phase separation, evolution with time of elastic G' and viscous G'' moduli and $\tan \delta = G''/G'$ were measured. Mixture D on the other hand remained liquid, since G'' was always greater than G' ($\tan \delta \approx 1.1-1.3$), then demixing within the gap of the rheometer was evidenced by large fluctuations of both moduli after ≈ 10 min measurement.

A $G''-G'$ crossover was detected rapidly at about ≈ 8 min ($\tan \delta = 1$) after sample loading. Then G' increased slowly, while $\tan \delta$ values decreased and stabilized at ≈ 0.7 after ≈ 1 h measurement. Very low moduli were measured ($G'' < G' < 5$ Pa), a weak network was formed but could not strengthen with time. In fact, phase separation was stronger than gelation, as both moduli started to decrease slowly from 2 h test. Finally G'' became higher than G' after $\approx 3-4$ h. The weak protein network would weaken while extending, and collapsed under its own weight (Croguennoc et al., 2001). Thereby there was no “true” gelation within mixtures E and F. This was more likely a transient thickening of the mixture which reduced the demixing rate but could not prevent it definitively.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

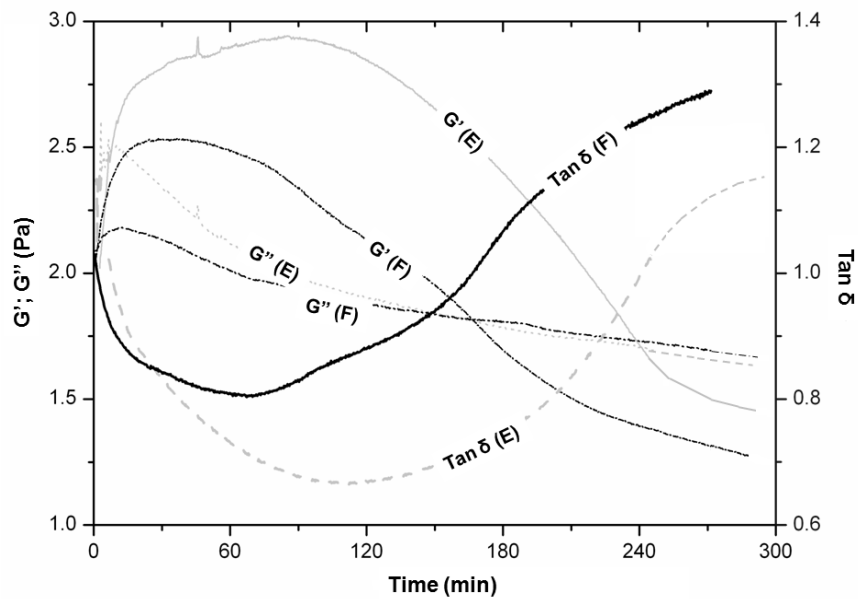


Figure 5: Dynamic moduli (G' ; G'') at 20°C as a function of time for the APP-Alg mixture 4-1.2 wt%. Applied stress was 0.7 Pa, while frequency was constant at 1 rad/s.

5. Conclusion

When pea protein aggregates were mixed with alginate, the level of phase separation was lower than that previously established for (quasi-) native pea globulin-alginate systems. While segregative effects took place, most of mixtures exhibited slow ripening of microstructure, where protein-enriched microdomains were organized rapidly into weak network of flocculated particles, possibly presenting gelling abilities. Such a thickening of the mixture hindered apparently phase separation, especially for concentrated mixtures. Attractive interaction between protein aggregates associated into clusters would strengthen with time. This led to micro-gelation of the clusters constitutive of protein microdomains. However such a protein network could not oppose sufficiently to demixing process. More investigation is thus needed to induce this time significant sol-gel transition of the system. This is in fact the object of the following study, dealing with the cold-set gelation of the pre-aggregated pea proteins-alginate mixtures.

References (*cf partie Références bibliographiques en fin du présent document*)

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

5.1.3. Résultats principaux

Cette étude se consacrait d'abord à la formulation d'agrégats thermiques de globulines de pois - APP, à l'opposé des globulines faiblement dénaturées - PPN (= LPP en anglais). Une population d'agrégats polydisperses a été obtenue à partir d'une concentration initiale en protéines de 8 % (m/m), de tailles nettement supérieures à 700 kDa. Une taille moyenne a été déterminée à près de 1200 ± 200 kDa. Alors que la dénaturation par chauffage ferait intervenir des interactions non-covalentes (électrostatique, hydrogène...) au cours de la dissociation et du déploiement des globulines natives, la présence de NEM ou de DTT semblait modifier légèrement la voie d'agrégation. Des échanges de ponts disulfures pourraient se produire localement, probablement de manière intra-chaîne. D'après les profils électrophorétiques par SDS-PAGE; l'agrégation entre sous-unités de globulines dissociées se ferait principalement par interactions physiques non-spécifiques. Les chromatogrammes par SEC-HPLC montraient qu'une partie des globulines (environ un tiers) étaient dénaturées mais ne se réassociaient pas. L'ajout de NEM au préalable du traitement thermique favoriserait une agrégation plus aléatoire via des interactions hydrophobes, du fait d'une plus haute flexibilité des chaînes apolaires de polypeptides déployées.

Une fois les agrégats formés, des mélanges de globulines pré-agrégées-alginate (APP - Alg) ont été formulés. Malgré des effets ségrégatifs plus prononcés que lorsque les globulines natives PPN étaient utilisées, la concentration en alginate apparaissait plus élevée dans la phase enrichie en protéines. Ainsi la plupart des mélanges incompatibles ne pouvait atteindre un minimum d'énergie par déphasage. Les études de microstructure ont montré que la maturation de la phase protéique était fortement ralentie par la gélification de celle-ci, induite probablement par surconcentration des protéines dans leur phase enrichie. Cela a été observé en particulier pour des mélanges protéines pré-agrégés - alginate concentrés, de compositions initiales 4-1,2 et 6-0,8 % (m/m). Cet état figé apparaissait cependant temporaire, car le réseau formé était trop faible et finissait par s'écrouler sous son propre poids, comme cela a été observé par rhéologie dynamique.

Maintenant que le comportement de phase du système protéines pré-agrégées-alginate a été décrit, il s'agissait d'effectuer sa gélification à froid par le procédé décrit en **partie 3.1.1.2** et déjà expérimenté sur des mélanges globulines natives-alginate à la **partie 4.3**.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

5.2. La gélification à froid et *in situ* de mélanges de globulines de pois pré-agrégées-alginate

5.2.1. Enjeux

Suite à l'étude du comportement de phase du système évoquée ci-dessus, l'introduction de l'agent acidifiant GDL et de carbonate de calcium (CC) insoluble à pH 7.2 induit dans le temps des modifications des paramètres du solvant qui vont conduire à une réduction des répulsions électrostatiques entre biopolymères incompatibles. La concentration en GDL a été fixée à 1% (m/m) et deux quantités de CC à 10 et 20 mM ont été testées. La cinétique d'acidification (i) a été évaluée selon le type, la concentration en biopolymères et la quantité de CC. Les propriétés rhéologiques en termes de (ii) rhéologie aux faibles déformations des gels multi-composés ont été comparées à celles des biopolymères seules pris séparément aux mêmes concentrations initiales. La microstructure (iii) des mélanges gélifiés a été analysée par MCBL et (iv) les séries d'images traitées par la méthode des co-occurrences décrite **partie 3.2.2.3**. Cette méthodologie permettrait de caractériser objectivement les « textures » d'images observées, aussi une classification a été opérée en réduisant les paramètres d'image obtenus par ACP. La corrélation propriétés rhéologiques-microstructure était l'objectif principal animant nos investigations. Enfin, le MET (v) pouvait apporter des données structurelles sur les gels mixtes à une échelle moléculaire.

5.2.2. Gélification à froid d'un système aqueux globulines de pois-alginate par libération *in situ* de calcium (Manuscrit 2)

Identiquement à la **sous-partie 5.1.2.1**, cette étude est présentée sous forme d'article. Ont été ajoutés en **sous-partie 5.2.3-4** des résultats complémentaires accolés à l'article (**Figures additionnelles...** et commentaires en anglais figurant italiques dans le texte), ainsi que des données non montrées mais évoquées dans le présent **Manuscrit 2**.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

The effects of sodium alginate and calcium levels on the cold-set gelation of pea proteins

Abstract

A multi-scale investigation of pea proteins – alginate cold-set gels was proposed in this study. The gel preparation followed a two-steps procedure. Globular pea proteins were first denatured and aggregated by a pre-heating step. Sodium alginate was then added at different concentrations. Thereafter the *in situ* gelation was induced at 20°C using glucono- δ -lactone (GDL) and two calcium carbonate (CC) levels; calcium cations were released as the pH decreased. Small-amplitude rheology measurements (storage modulus G') showed that stronger mixed gels were obtained than single-biopolymer solutions. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) revealed phase-separating microstructures of mixed gels, foremost owing to biopolymers incompatibility. Phase separation was kinetically entrapped by gelation at different evolution stages. According to the co-occurrence method and microstructure classification, image texture analysis disclosed that a continuous protein network dispersing small gelled alginate microdomains corresponded to the strongest mixed gels. Transmission electron microscopy (TEM) evidenced that during gelation, the pre-aggregated proteins were mainly associated into large agglomerates presenting no peculiar pattern. Higher cohesiveness between both networks was hypothesized, since protein microdomains exhibited apparently at their surface “anchoring points” for alginate chains. Depending on both protein - alginate initial composition and calcium availability, non-specific inter-biopolymer cross-links via calcium were assumed to be the key factor of synergism within mixed gels.

1. Introduction

Globular proteins are widely encountered in semi-solid food products, contributing to their nutritional value and their textural characteristics. Amongst these latter, the gelling ability represents one of the most relevant physicochemical properties of food proteins. Usually, protein gels are prepared by heat-treatment, whereby successively induces unfolding of compact structure of native globulin, exposure of initially-buried hydrophobic residues and

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

subsequent aggregation of denatured proteins. When aggregated proteins exceed a concentration threshold, they could associate into tridimensional network thence occupying the whole solution volume. Depending on protein concentration and gelation conditions such as temperature, ionic strength and pH of the solvent, several structures of heat-set protein hydrogels are produced, related to aggregation route of unfolded proteins (Clark, Kavanagh, & Ross-Murphy, 2001; Langton, & Hermansson, 1992). However, owing to concomitance of thermal denaturation and aggregation phenomena, the gelation procedure above cannot genuinely be undertaken with heat-sensitive compounds for instance in novel functional food systems (Maltais, Remondetto, & Subirade, 2009).

To date, the overall tendency is to substitute animal proteins with sustainable and cheaper plant proteins such as soy proteins, whose isolates dominate the global market (Boye, Zare, & Pletch, 2011). Other alternatives thus need to be sought out; in fact globular proteins from dry pea seeds would be a valuable source and were therefore chosen for this study. About 80% of the total storage pea proteins are pea globulins, composed of both vicilin/convicilin 7S (≈ 150 and ≈ 180 -210 kDa, respectively) and legumin 11S (≈ 360 kDa) (Tzitzikas, Vincken, De Groot, Gruppen, & Visser, 2006). Each fraction is a complex mixture of several subunits constitutive of high molecular weight oligomers. Current studies deal with pea globulins thermal gelation (O’Kane, Happe, Vereijken, Gruppen, & van Boekel, 2004_{a-c}; Shand, Ya, Pietrasik, & Wanasundara, 2007; Sun & Arntfield, 2010). On the other hand genetic variation, time-consuming protein extraction regarding poor recovery yields and extensive heat-treatment procedures would add complexity to the use of pea globulins utilization as a texture improver for human food.

Alternatively, cold-set gelation of globular proteins could be achieved by adding slowly salts such as divalent cations (Ca^{2+}) to a pre-denatured protein solution. This was initially reported for whey proteins and more currently to soy proteins (Barbut & Foegeding, 1993; Maltais, Remondetto, Gonzalez, & Subirade, 2005). The method consisted of two dissociated steps (Bryant & McClements, 1998). First the protein solution at a concentration generally below 10% (w/w) was heated to yield a suspension of stable and repulsive protein aggregates, at a pH value far from the isoelectric point (pI) and at low ionic strength. Then electrostatic repulsions could be reduced by adding Ca^{2+} cations at room temperature. Thermal aggregates could assemble thereafter into fine-stranded or particulate gel structures, given that the amount of calcium applied (Maltais, Remondetto, & Subirade, 2008).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Adding a polysaccharide to the protein solution could be performed before the second step of the cold-set gelation process (Jong, Klok, & van de Velde, 2009). Here, the cold-set gelation of whey protein aggregates mixed with neutral/charged polysaccharides was operated by the slow acidification of the media, in presence of glucono- δ -lactone (GDL) which upon hydrolysis to gluconic acid released protons. Gelation rate was shown to be easily modified by changing either the GDL amount or the incubation temperature. The polysaccharides tested were in non-gelling conditions and filled gels were obtained. More interestingly, mixed gels made of both gelling protein and polysaccharide would exhibit greater range of microstructures and enhanced textural properties than single-biopolymer gels. Gelation behavior of various multicomponent systems in presence of calcium was depicted in the case of heat-set gels (Beaulieu, Turgeon & Doublier, 1999; Donato, Garnier, Novales, Durand & Doublier, 2005). Meanwhile, published studies scarcely encompass cold-set gels using plant proteins. Pires Vilela, Cavallieri, & Cunha (2011) found that salt-induced gelation of soy protein aggregates - gellan gum promotes mixed gels properties, reflected by a low syneresis and an improvement of its mechanical abilities compared to single-protein gels. Aggregation and gelation of proteins was affected by the polysaccharide nature and concentration, but also solvent parameters (Jong et al., 2009). In fact protein and anionic polysaccharide in admixture are limitedly co-soluble, since inter-biopolymer interactions are often repulsive at alkaline pH (Tolstoguzov, 1995). Because of solvent affinity differences for dissimilar biopolymers mixed together, thermodynamic incompatibility results in a phase separation phenomenon. This is generally encountered when protein and anionic polysaccharide are both negatively charged. Then two coexisting phases are formed at the equilibrium state, while each phase is enriched with one biopolymer and depleted with the other. Before complete demixing occurred, phase-separating microstructure could be kinetically entrapped by gelation (Norton & Frith, 2001). Thus two networks could be formed in the volume fraction occupied by each gelling biopolymer. For such multi-component gels, synergism in overall gel strength could originate from lower minimum gelling concentrations than those for the corresponding single-biopolymer solutions.

In the present study, pea globulins were mixed with sodium alginate (Nussinovitch, 1997). Alginate is a linear polyelectrolyte composed of the guluronate (monomer G) residue and its C-5 epimer, the mannuronate residue (monomer M). Alginate chains are a sequence of homopolymeric (MM, GG) and heteropolymeric blocks (MG/GM). Ionotropic gelation of

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

alginate is achieved at ambient temperature. According to the egg-box model, dimmers of alginate chains cross-linked between GG junctions zones via bivalent cations (Ca^{2+}) (Grant, Morris, Rees, Smith & Thom, 1973; Morris, Rees, Thom, & Boyd, 1978). A tridimensional network was settled up by further aggregation of dimmers at sufficient calcium feed (Funami et al., 2009).

Phase separation at 20°C of low-denatured pea globulins-sodium alginate aqueous system in 0.1 M NaCl, pH 7.2 has been depicted previously (Mession, Assifaoui, Lafarge, Cayot, & Saurel, 2012_a – *PI*). In the present investigation, the pea globulins were thermically pre-denatured prior to sodium alginate addition at 20°C, so that both biopolymers would exhibit gelling abilities with calcium added (Pires Vilela et al., 2011). Using the solvent parameters used by Mession et al (2012_a – *PI*), the *in situ* gelation of protein aggregates mixed with alginate was performed at 20°C, in presence of GDL and calcium carbonate. The aim was to evaluate the relevance of this procedure, well-known to get homogeneous calcium-alginate gels, on gelation of mixed systems (Neiser, Draget, & Smidsrød, 1999). For that, gelation was investigated using small-amplitude rheology. Thereafter gel structure was analyzed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and transmission electron microscopy (TEM).

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Biopolymers

Both sodium alginate and low-denatured pea proteins were extracted respectively from alginate commercial powder (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and defatted Nutralys[®] S85M isolate (Roquette SA, Lestrem, France), as previously described (Mession et al.,-2012_a – *PI* & *P2*). Purified alginate contained 18.9 wt% salts (sodium: \approx 58 wt%; calcium: \approx 1.8 wt%) on a dry basis (d. b.). The intrinsic viscosity at 20°C of purified alginate was 493 mL/g in 0.1 M NaCl. The pea proteins isolate laboratory-prepared contained 92.5 wt% proteins and 7.4 wt% salts (d. b.). Calcium carbonate (CC) (98.5% of purity) was provided by Prolabo RP, Normapur (VWR, Radnor, Pennsylvania) with a particle size under 25 μm . The GDL and all other reagents purchased from Sigma-Aldrich were on analytical grade.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

2.1.2. Biopolymer stock solutions preparation

The pea proteins isolate and purified sodium alginate powders were dissolved at room temperature in deionized water (DW), under stirring in separated flasks. The protein solution was extensively dialyzed against DW, reaching a final pH of 7.4 ± 0.15 . The pea protein aggregates were prepared from the desalted protein solution, with a protein concentration adjusted to 8 wt%. The denaturation temperature of the protein solution was measured at $\approx 78.5^\circ\text{C}$, by differential scanning calorimetry (DSC). Complete thermal denaturation of pea globulins was checked by reheating the sample. Then the low-denatured protein solution was poured in a large glass vessel hermetically sealed, heated in a mineral oil bath from 40°C to 90°C at $4.2 \pm 0.3^\circ\text{C}/\text{min}$, kept at 90°C for 1 h, and quickly cooled in ice for 1 h. No insoluble particles were collected by centrifugation (12000g, 50 min, 25°C), meaning that the denatured protein solution contained heat-induced aggregates entirely soluble.

By size exclusion chromatography (SEC-HPLC), chromatogram of the pre-aggregated pea proteins solution exhibited one main peak eluting at more than 669 kDa in the calibrated column. It represents about $\approx 67\%$ of the total integrated area, while peaks corresponding to quasi-native pea globulins vanished after heat-treatment (results to be published elsewhere). High molecular weight thermal aggregates were produced, stable to dilution.

Stock solutions of aggregated pea proteins and sodium alginate were dialyzed at 4°C (24 h, 4 changes) against a salt buffer containing 0.1 M NaCl and 10 mM tris-HCl, pH 7.2, with a biopolymer stock solutions-to-buffer ratio of 1:20. The final concentrations of protein and alginate stock solutions, 7.8 wt% and 3.2 wt%, respectively, were measured by titration methods-used previously (Mession et al., 2012_{a,b} - *P1* & *P2*).

2.1.3. Single-biopolymer/mixed gels preparation

Single-alginate, single-protein solutions and aggregated pea proteins-alginate mixtures compositions are listed in Table 1. Each solution/mixture was formulated by mixing the biopolymer stock solutions in fine tubes, completed to 1.5 g with the salt buffer used for dialysis of the stock solutions, and stirred vigorously with a vortex for 1 minute. The CC powder was then poured, and stirred in the media for 30 seconds to ensure its homogeneous dispersion. The GDL powder was finally added to each solution and/or mixture, thereafter re-stirred for 10 s.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Table 1

Compositions of single-aggregated pea proteins (APP), single-alginate (Alg) solutions, and APP-Alg mixtures for gelation experiments conducted at 20°C, in the presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM calcium carbonate (CC).

APP/CC (wt%/mM) Alg/CC (wt%/mM)	0	4
0	-	No gel
0.4	0.4/10; 20	4-0.4/10; 20
0.8	0.8/10; 20	4-0.8/10; 20
1.2	1.2/10; 20	4-1.2/10; 20

2.2. Methods

2.2.1. Continuous pH monitoring and free calcium release

The pH variation as a function of time was firstly measured in the salt buffer used for dialysis of biopolymer stock solutions. Two blank solutions B₁₀ and B₂₀ were considered, containing 1 wt% GDL and 10 and 20 mM of CC, respectively. Consecutively to CC dispersion in the media under stirring, time $t = 0$ was set when the GDL powder was poured. Kinetics of acidification was assessed by continuous pH monitoring with a pH meter Consort C561 (Turnhout, Belgium) until pH at equilibrium was reached. The slow hydrolysis of GDL lowered the pH of the media, releasing calcium from CC. Free calcium concentration in blank solutions was measured with a calcium-selective electrode (ISE25Ca, Radiometer Analytical, Lyon, France) and recorded with an ionic specific reader (model PHM21). A calomel-saturated electrode was used as reference (REF421). Calibration was done in the range of 1-50 mM calcium with freshly-prepared CaCl₂ solutions in the dialysis buffer of biopolymer stock solutions. Thereafter pH kinetics was followed in single-alginate and protein solutions, as well as in alginate-protein mixture.

2.2.2. High field ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR)

Purified alginate sample was pre-hydrolyzed according to Grasdalen, Larsen, & Smidsrød (1979) and Grasdalen (1983). ¹H NMR in D₂O was carried out at 70°C using a 600 MHz Bruker spectrometer, to determine frequencies F of diad and triad sequences of the monomers M and G. Spectra analysis was performed using NMR Notebook software (V.2.6).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

The M/G ratio was 44/56, while the different sequences composition was $F_{GG} = 0.19$; $F_{GM} (= F_{MG}) = 0.37$; $F_{GGG} = 0.12$; $F_{GGM} (= F_{MGG}) = 0.07$; $F_{MGM} = 0.3$.

2.2.3. Small-strain oscillatory shear measurements

All the rheological measurements were performed on a controlled stress rheometer (SR-5 Rheometric Scientific - Piscataway, NJ) using parallel plate-plate fixture (25 mm diameter), equipped with a Peltier temperature controller and managed by the RSI Orchestrator software (V.6.5.8). Structural changes undergone by the studied material upon gelation were recorded at 20°C. Both the elastic modulus (G') and the loss modulus (G'') parameters were recorded, endowing viscoelastic properties. The loss factor, $\tan \delta$, was thence computed as the G''/G' ratio. Measurements were performed before gelation and on gelled material within the linear viscoelastic region, determined from stress-sweep tests (0.3 – 10 Pa) at a frequency of 1 rad/s. Samples in Table 1 (excepted blank solutions B_{10; 20}) were prepared according to the procedure described in part 2.1.3, and loaded as fast as possible on the lower plate of the rheometer. Then the upper plate was lowered to give a gap width of 0.5 mm. Edges of the sample were covered with paraffin oil to prevent its dehydration upon testing procedure. Measurements consisted firstly of a time-sweep test at 0.7 Pa initial stress amplitude and 1 rad/s frequency. Gelation was considered as achieved when both moduli oscillated slightly around a final mean value ($\pm 10\%$). Secondly, a frequency-sweep test (10-0.06 rad/s) at fixed stress (0.7 Pa) was performed to characterize viscoelastic properties of the gelled sample. Features retained were the gel point G_p from which the elastic modulus G' of the material tested was predominant (Jong et al., 2009), evolution of $\tan \delta$ and G' , final G' modulus, and frequency-dependence of G' and G'' moduli, by calculating the slope of a log-log plot. Data presented are means of at least duplicates \pm standard deviation (SD).

2.2.4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

The microstructure of biopolymer mixtures was studied by CLSM using a TE-2000 Eclipse microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) in fluorescence mode, with a magnification level of 20. The light source was a Ne-Ar beam laser. Pre-aggregated pea proteins were non-covalently stained by adding 0.01 wt% rhodamine B isothiocyanate (RITC in DW, 1 mg/mL) to the protein stock solution, under stirring in dark for 1 h at 4°C (Donato et al., 2005). Excitation and emission wavelengths for RITC-labeled proteins were 543 nm

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

and between 560 and 590 nm, respectively. It was checked that labeling did not modify the rheological behavior of the mixtures.

Following the aggregated pea proteins-alginate mixtures preparation, several aliquots (20 μL) were quickly deposited between the slide and cover slip, hermetically sealed. No more microstructure evolution occurred after 16 h incubation with GDL/CC. At least 25 images were taken on the final mixture. Images of 635.5 x 635.5 μm at a resolution of 512x512 pixels were converted into gray scale, with levels ranging from 0 (black color) to 255 (white color). Background correction was performed to reduce artifacts/noise from the optical equipment.

2.2.5. Image texture analysis

A phase-separating microstructure was characterized by an inhomogeneous repartition of the fluorescence brought by labeled proteins (Mession et al., 2012_{a,b}). Consequently the unstable mixture resulted in one protein enriched-phase (clear areas) coexisting with a dark polysaccharide-enriched phase.

Images are “textured” when the pixel gray value intensity distribution is not uniform. To discriminate the different image textures, the image normalized variance was calculated from the gray value histogram (Mession et al., 2012_a). The co-occurrence method was applied to each CLSM micrograph (Haralick, 1979). A similar approach has been used for heat-set gels of bovine serum albumin-low methoxyl-pectin mixtures (Donato et al., 2005). The co-occurrence method is based on the repartition of intensity pixels in a given direction and distance. In the present study, only adjacent pixels were considered. From an intensity image, a gray-level co-occurrence matrix is established by counting the number of times a pixel of gray level “ i ” is adjacent to a pixel of gray level “ j ”. Each element of the co-occurrence matrix is the frequency “ f ” of the pixels pair gray value “ $f_{i,j}$ ”. Image parameters are then computed from the matrix: “contrast” (high value relative to consistent gray level variations, when small “objects” are spread all over the image); “correlation” (high when the image contained large areas (or “objects”) of the same gray level intensity); “energy” (a value of 1 is related to a perfectly uniform image); “homogeneity” (or differential inverse moment, high for neighboring pixels of a similar intensity). Further parameters reduction was performed by Principal Component analysis (PCA) using Matlab software (The Mathworks, Inc.,

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

v.7.5.0.342) (Jolliffe, 2002). The two first components were kept as they explained more than 85% of the variance between samples.

It was checked that whatever was the direction of choice; image texture had no particular orientation. Optical settings (contrast, brightness) did not influence the results of the image analysis. Only pairs of adjacent pixels in the direction “north” to “south” were considered.

2.2.6. Transmission electron microscopy (TEM)

Single-aggregated pea proteins gel of composition 4/20 and protein-alginate gelled mixtures 4-0.4/20 and 4-1.2/20 (Table 1) were prepared in Eppendorf tubes (1.8 mL) and left for 16 h at 20°C to allow gelation to take place. Gelled samples were cut with a razor blade into pieces (3x5x5 mm), fixed for 3 h at 4°C with 3 % (v/v) glutaraldehyde and 2 % (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7) and then washed with phosphate buffer. Samples were post-fixed in 0.5% (w/v) OsO₄ for 1 h at 4°C and washed again with the phosphate buffer. Samples were dehydrated using a graded series of ethanol (30% and 50% (22°C) for 30 min, 70% (4°C) overnight, then 70%, 90% and 100% at 22°C for 30 min), followed by embedding in graded series of EPON (Embed 812, EMS, England) diluted in propylene oxide. Blocks were polymerized at 60°C for 3x24 h, then thinly sliced (~90 nm) using an ultramicrotome (Reichert, Switzerland). Ultrathin cuts were divided into two groups: for (positive) protein staining, ultrathin cuts were collected on copper coated grids and stained using Reynolds lead citrate and uranyl acetate. For the second group, ultrathin cuts were collected on gold grids and PATAg (periodic acid-thiocarbohydrazide-Ag proteinate) test was performed to stain carbohydrate moieties containing 1→3 vicinal-glycol functions, such as alginate (Hall, 1991). The grids were examined using a H600 electron transmission microscope (Hitachi, Tokyo, Japan) operated at 80 kv accelerating voltage.

3. Results and discussion

3.1. Kinetics of acidification

Blank solutions B₁₀, B₂₀. Adding 10 or 20 mM CC alone provoked a rapid pH increase from 7.2 to ≈7.6. This was probably due to the limited dissociation of CC and slight

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

release of carbonate ions. In presence of 1 wt% GDL, acidification was triggered promptly (Fig. 1).

After a couple of minutes, a first pH drop to ≈ 6.3 was noted. Then a slower pH decrease step took place, shorter for B_{10} (≈ 1 h of incubation) than for B_{20} (≈ 2 h) blank solution, followed by higher acidification rate until pH was close to ≈ 4.2 . This indicated that acidification kinetics was two times faster for the lowest CC amount (B_{10}). The counter-acidifying effect of carbonate ions increased with the CC amount. The CC dissociation increased pH, accordingly reducing acidification rate. Close to pH at equilibrium (≈ 3.5) for long incubation times (>2 h and >4 h for B_{10} and B_{20} , respectively), the low pH decrease rate by GDL hydrolysis was due to equilibrium between gluconic acid and lactone (Hong & Chin, 2010).

In the first hour of incubation, free calcium release profiles practically overlapped for both blank solutions. About ≈ 5 mM was released in both cases after 30 min incubation, while pH was ≈ 6.1 and ≈ 6.3 for B_{10} and B_{20} , respectively. Consequently the strong carbonate release lowered the pH decrease, as mentioned above; calcium release was more likely time-dependent phenomenon than pH-dependent. For B_{10} , the calcium release stopped practically from pH ≈ 4.7 . For B_{20} , more calcium than in B_{10} was released while acidification was still occurring. Equilibrium between free calcium and un-dissociated CC decreased calcium release rate for long incubation time. After 16h of incubation the final calcium concentration was 5.5 ± 0.8 and 14.1 ± 1.3 mM for B_{10} and B_{20} , respectively. This corresponded to $\approx 70\%$ of the CC amount which dissociated in both cases. The large particle size of CC was reported to decrease its dissociation rate, as it was the case in this present study (part 2.1.1.) (Neiser et al., 1999).

Single-alginate solutions at 0.8%wt. Acidification rates were higher than in blank solutions, until pH reached ≈ 4.2 (Fig. 2). The first pH decrease was more abrupt in the presence of 10 mM CC, due to the lower counter-acidifying effect with the lowest CC amount. Alginate did not exhibit peculiar buffering capacity at pH >4 (Nussinovitch, 1997). The pH values at equilibrium (≈ 6 h) were ≈ 3.5 for both alginate solutions 0.8/10 and 0.8/20, close to those found in blank solutions B_{10} and B_{20} . For both CC amounts, acidification rate with alginate at the beginning of incubation stage was higher than in blank solutions. This contradicted what was reported by Hong et al. (2010); an enhanced dissociation of CC in the presence of alginate was not observed here, otherwise the pH decrease would be slower than

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

in blank solution. It was noted however that acidification rate decreased from pH ≈ 6.4 and ≈ 4.5 with 20 mM and 10 mM CC amount, respectively. Since there was no intermediate step of lower pH decrease following the first pH drop, dissociation of CC in the presence of alginate would be slower and thus would be enhanced at lower pH (≈ 4.2) than in blank solutions.

Single-aggregated pea proteins solutions at 4 wt%. Acidification rates at the beginning of incubation were also higher than in blank solutions, probably owing to a rapid protein charge screening with low amounts of calcium released, reducing its buffering capacity for pH values higher than ≈ 5.5 . In parallel, it was noted in a previous study that solubility of (quasi-) native pea globulins decreased sharply from pH ≈ 7 to ≈ 6 (Mession et al., 2012_b). The pH decrease was not significantly affected by the CC amount at the beginning of incubation. Higher dissociation rate of CC was expected from pH ≈ 5.5 . It was reached more quickly (≈ 50 min) with proteins and indifferently of the CC amount than in the case of blank solutions (1h10 for B₁₀, 2h30 for B₂₀). At pH lower than 5.5, the acidification rate was in fact reduced more with 20 mM CC than with 10 mM. For long incubation times (≈ 16 h), the pH values at equilibrium were 4.6 ± 0.1 and 4.2 ± 0.2 for aggregated pea proteins APP/CC solutions 4/10 and 4/20, respectively. Such values were close to the pK_a of the glutamic/glutamate (4.5), enhancing the buffering capacity of proteins at pH lower than 5.

The pH decrease of protein-alginate/CC mixtures 4-0.8/10; 20 showed a slight pH deviation (± 0.15 units) compared to single-protein control solution (Neiser et al., 1999). Thereby proteins governed the acidification rate of the whole mixture.

To overcome the effect of GDL hydrolysis and CC dissociation kinetics during gelation, incubation times were converted into pH values, from Fig. 2.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

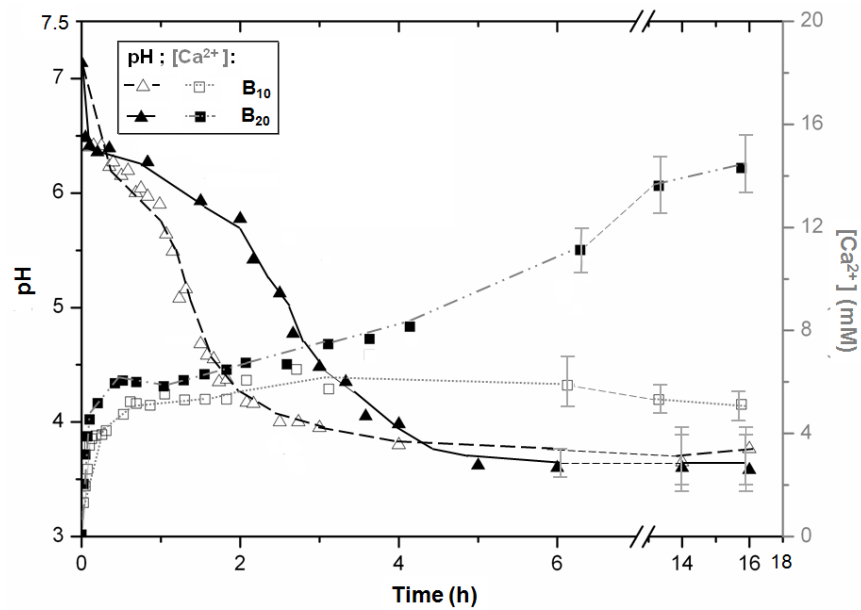


Fig. 1: pH variation with time at 20°C (left axis) and free Ca^{2+} cations released (right axis) in blank solutions B₁₀ and B₂₀ prepared in 0.1 M NaCl, containing 1 wt% GDL with 10 and 20 mM CaCO_3 , respectively.

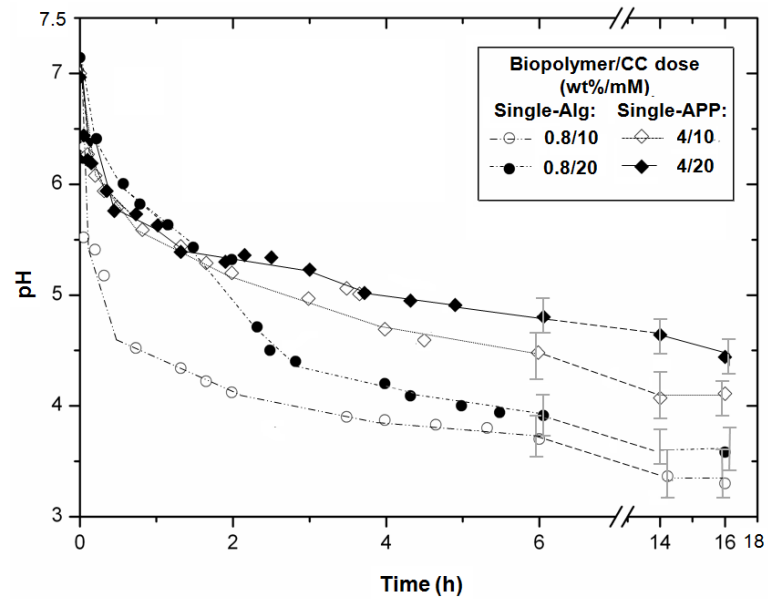


Fig. 2: pH variation with time at 20°C for single-aggregated pea proteins (APP) and alginate (Alg) solutions in 0.1 M NaCl, in presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM calcium carbonate (CC).

3.2. Rheological measurements

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

For all mixtures listed in Table 1, the viscous behavior ($G'' > G'$, $\tan \delta > 1$) was first predominant, until the G' modulus increased dramatically ($G' \gg G''$, $\tan \delta \ll 1$) from the gel point G_p . This indicated that macroscopic gelled network was formed (Jong et al., 2009). G_p was given as the time/corresponding pH value from which the sol-gel transition was noted. Gelation was achieved after ≈ 6 h and after ≈ 16 h of incubation in the presence of GDL/CC for single-alginate solutions and aggregated pea proteins-alginate mixtures, respectively.

3.2.1. Single-alginate solutions

Single-alginate gels were homogeneous and transparent. The G_p (in time) increased with alginate concentration, at both CC amounts (Table 2a). At 10 mM CC, the G_p values (in pH units) decreased from ≈ 5.5 to ≈ 4.8 by leveling up alginate concentration, while at 20 mM CC the G_p values were practically constant around pH ≈ 6.2 . At a given alginate concentration, G_p values (in time) were close whatever was the CC amount, meanwhile the corresponding G_p (in pH) value was higher at 20 mM CC than that at 10 mM; the release of carbonate ions and so calcium was suggested to increase from pH ≈ 6.4 , since the acidification rate started to be reduced from this pH (single-alginate solution 0.8/20, Fig. 2). At the lowest CC amount, enhanced calcium release at acidic pH would be necessary with increasing alginate concentrations, to trigger network formation. On the one hand, the calcium incorporation rate within alginate junction zones increased by increasing the $[Ca^{2+}]/[Na^+]$ ratio; increasing the calcium availability enhanced alginate affinity for the bivalent cation (Neiser et al; 1999). This phenomenon could explain the delayed alginate gelation at the lowest CC amount, noted for both solutions 0.8/10 and 1.2/20. Physical factors such as viscosity of concentrated alginate solutions would reduce the CC dissociation rate, and thus calcium diffusion to unoccupied binding sites of alginate chains (Funami et al., 2009). At 0.4 wt% concentration, a few alginate chains cross-linked rapidly via released Ca^{2+} cations. Given that both increasing number of binding sites and chains entanglements with alginate concentration, random inter-chains cross-links via Ca^{2+} cations could be hypothesized at relatively low calcium amount released. Alginate gelation was apparently triggered earlier with the highest CC amount. One reason could be the high media viscosity, which depleted homogeneous CC dispersion (Fang et al., 2007). Leveling up alginate concentration can also be responsible for reduced chain diffusion by rapid gelation (Jørgensen, Sletmoen, Draget, & Stokke, 2007).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Table 2

Time and corresponding pH value (from Fig. 2) where the gelation point G_p at 20°C was detected, for: (a) single-alginate (Alg) solutions; (b) aggregated pea proteins (APP) - alginate mixtures, in the presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM CC.

Table 2a

Alg/CC (wt%/mM)	0.4/10	0.4/20	0.8/10	0.8/20	1.2/10	1.2/20
Time (min)	5±1.5	9.2±1.7	24.5±7.3	21±7.5	36.7±2.6	20.3±3.6
pH	5.46±0.06	6.33±0.05	5.01±0.2	6.23±0.1	4.76±0.03	6.21±0.05

Table 2b

APP-Alg/CC (wt%/mM)	4-0.4/10	4-0.4/20	4-0.8/10	4-0.8/20	4-1.2/10	4-1.2/20
Time (min)	63.3±8.7 ^a	40.7±1.1	65.8±4.7	58.9±11.3	70.7±7.2	61.5±1.1
pH	5.47±0.08	5.8±0.15	5.44±0.07	5.7±0.09	5.42±0.01	5.54±0.01

^aValues are means±SD of at least duplicated experiments.

Table 3

Frequency-dependence of G' and G'' moduli at 20 °C, for: (a) single-alginate solutions (Alg); (b) aggregated pea proteins (APP) - alginate mixtures, in the presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM CC.

Table 3a

Alg /CC (wt%/ mM)	0.4/10	0.4/20	0.8/10	0.8/20	1.2/10	1.2/20
G'	0.26±0.04 ^a	0.55±0.17	0.6±0.02	1.2±0.02	0.64±0.05	3±0.32
R^2	0.97 ^b	0.94	0.94	0.93	0.96	0.88
G''	0.1±0.02 ^a	0.24±0.03	0.17±0.02	0.38±0.07	0.34±0.04	1.3±0.17
R^2	0.9	0.92	0.88	0.85	0.91	0.83

Table 3b

APP-Alg/CC (wt%/mM)	0.4/10	0.4/20	0.8/10	0.8/20	1.2/10	1.2/20
G'	1.34±0.34	1.49±0.2	2.26±0.26	3±0.08	1.26±0.12	3.7±0.47
R^2	0.88	0.89	0.91	0.86	0.93	0.92
G''	0.44±0.08	0.39±0.02	0.52±0.06	0.6±0.01	0.61±0.07	0.96±0.01
R^2	0.92	0.86	0.85	0.84	0.97	0.89

^aValues±SD are calculated as the slope of $\log G'$ (or G'') vs \log frequency, from at least duplicated experiments. ^b Correlation coefficient.

Fig. 3 presents gelation curves as a function of pH of some alginate solutions. The strength of the alginate network depended on calcium feed, since gels of alginic acid were not

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

obtained at pH higher than ≈ 3.5 (Funami et al., 2009). At 20 mM CC and from pH ≈ 6.2 , $\tan \delta$ values dropped quickly and the G' modulus increased with alginate concentration; both higher number of chains and concentration of Ca^{2+} -binding sites were involved into inter-chains junction zones, allowing network formation. Close to the pH at equilibrium ($\approx 3.8-4$), more calcium was released as strengthening held on, particularly for the single-alginate solution 1.2/20; longer incubation time would allow better calcium-occupancy of binding sites, giving rise to higher final G' modulus. The calcium feed at 10 mM CC limited strengthening of the alginate network; from 0.8/10 to 1.2/10, the final G' value declined to ≈ 57 Pa.

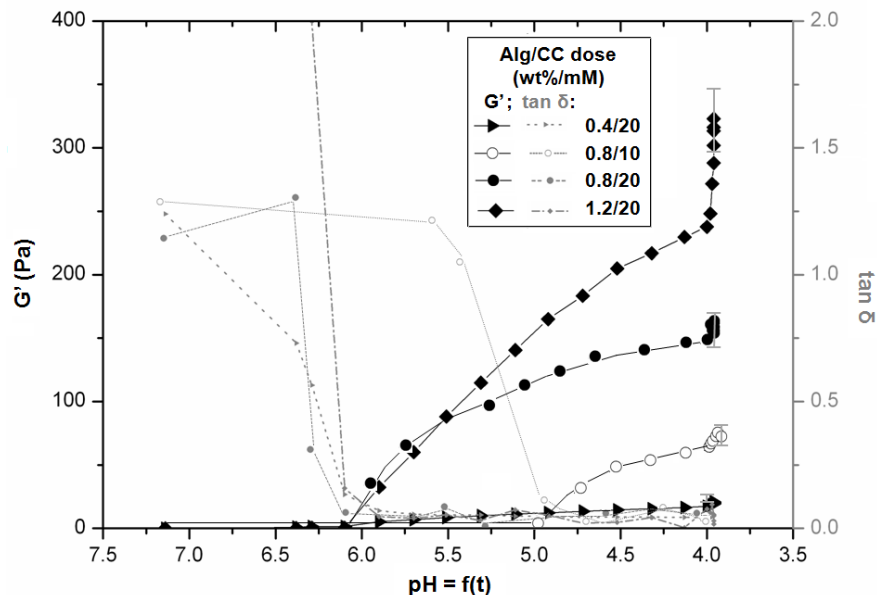


Fig. 3: Variation of storage modulus G' (left axis) and $\tan \delta$ ($=G''/G'$) (right axis) at 20°C as a function of pH, for single-alginate (Alg) solutions in 0.1 M NaCl, in presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM calcium carbonate (CC).

The mechanical spectra of single-alginate solutions (0.8/10; 20 presented on Fig. 4) displayed a G' modulus higher than G'' in the whole frequency range. Both G' and G'' moduli were frequency-dependent; they decreased more markedly in the low frequency-range for gels prepared at 20 mM than at 10 mM CC, as well with higher alginate concentration (from the calculated slopes, Table 3a). This would reflect an increasing number of loose chain ends due to their random dimerization into heterogeneous network (Jørgensen, et al., 2007). All the gelled alginate solutions displayed $\tan \delta$ values at 1 rad/s around ≈ 0.05 , indicating that

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

the stable networks were structured similarly. Thereby complexity arise from increasing gelation time with alginate chains density in the media (i. e. concentration), as the maximum number of cross-links was limited by the slow diffusion of the chains.

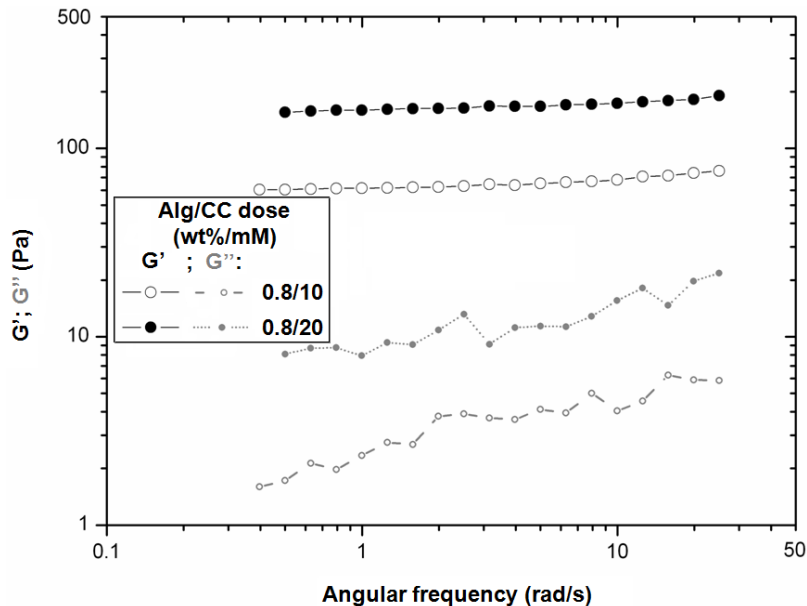


Fig. 4: Frequency-dependence at 20°C of storage modulus G' and loss modulus G'' for single-alginate (Alg) gelled solutions at 0.8 wt% in 0.1 M NaCl, in presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM calcium carbonate (CC).

Moreover, the marked viscous contribution upon mechanical properties of gelled single-alginate solutions could originate from the reduced number of G-enriched junction zones involved into network formation. From ^1H NMR data, the alginate sample contained particularly long poly-alternating MG sequences; therefore its gelation would diverge from the egg-box model (Donati et al., 2005). At low calcium feed, the authors reported that alginate chains of high MG content could associate between MG and GG blocks. Meanwhile when pH was lower than 4, a high calcium feed would favor more likely inter-chains association between GG homogeneous blocks, of higher elasticity than previously (Funami et al., 2009). This could explain also the late G' increase in the end of incubation (Fig. 3).

3.2.2. Single-pre-aggregated pea protein solutions

Acidification of the single-protein solutions by adding GDL at 1 wt% with 10 or 20 mM CC amount caused a rapid collapse of both G' and G'' moduli, before any G_p was

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

reached (data not shown). The abrupt decrease of solubility between $\text{pH} \approx 7$ and ≈ 6 would induce more likely pea globulins precipitation rather than their gelation (Shand et al., 2007). Then lower GDL levels of 0.35; 0.4 and 0.45 wt% were tested to allow gelation of single-protein solutions at 4; 6 and 8 wt%, respectively, though no gel was settled up with 10 mM CC. With 20 mM CC, the release of carbonate ions prevented the rapid pH drop-off. At the end of gelation, the final G' values were ≈ 35 ; ≈ 60 and ≈ 75 Pa for single-protein gels at 4; 6 and 8 wt%, respectively. The $\tan \delta$ values were close to ≈ 0.25 in all cases, significant of weak protein gels (Sun et al., 2010). A pronounced syneresis would reflect protein over-aggregation (Bryant et al., 1998). Furthermore, single-protein gels disrupted easily into small clusters, faintly interconnected. Such precipitates were in fact attributed to a salting-out effect. Similarly, Pires Vilela et al. (2011) reported that direct calcium addition did not lead to homogeneous gelation of thermally pre-aggregated soy proteins, rather their spontaneous coagulation by rapid charge screening.

3.2.3. Pre-aggregated pea proteins - alginate mixtures

No apparent syneresis was pointed out for aggregated pea proteins – alginate mixed gels, probably due to the high hydrophilic nature of alginate chains (Nussinovitch, 1997). At 20 mM CC amount, white opaque gels were produced. This was due to random protein aggregation (Langton et al., 1992). The mixed gels 4-0.4/10 and 4-1.2/10 were locally heterogeneous; white clusters were suspended in a turbid phase, attributed to protein coagulates. This could denote that gelation entrapped microstructure in the late stages of phase separation (Pires Vilela et al., 2011).

Time at G_p and corresponding pH value are listed in Table 2b. Gelation of mixtures with 20 mM CC was generally triggered at lower pH (≈ 5.6) than the single-alginate solutions at the same initial concentration (≈ 6.2). For the studied aggregated pea proteins-alginate mixtures, G_p took place generally within ≈ 1 h, while pH was between ≈ 5.4 - 5.8 , indifferently of the CC amount. This would denote for the highest CC amount that more bound calcium was necessary to trigger network formation than in single-alginate solutions. As stated above, viscosity effects due to alginate coordinating Ca^{2+} cations would reduce their diffusion with time towards binding sites. A partition of free calcium between mixed biopolymers was also assumed, delaying network(s) formation. Now considering mixture compositions 4-0.8/10 and

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

4-1.2/10 where the CC amount was shown limited for single-alginate solutions 0.8/10 and 1.2/10 (part 3.2.1), gelation of mixtures would be less calcium-dependent. In this case, an alginate network would not be solely involved.

Fig. 5 summarizes gelation profiles of selected aggregated pea proteins – alginate mixtures. A decay between G''/G' cross-over ($\tan \delta = 1$) and the “true” onset of gelation reflected by the dramatic increase of the G' modulus from $\text{pH} \approx 5.4$ was noted for the mixtures 4-0.4/10; 20 and 4-1.2/20. In fact the rheometer detected the sol-gel transition for these mixtures at pH values in the range of ≈ 6.4 , and despite strengthening of the gel structure occurring at more acidic pH (Table 2). Local chain entanglements due to micro-gelation with low amounts of calcium could traduce these findings. Such a mechanical response would be as long as calcium feed is not sufficient to increase significantly the number of cross-links within biopolymer network(s). At 20 mM CC, G' grew up more steeply with increasing alginate concentration. It appeared that gelation of mixtures took place in a narrower pH range (≈ 5.4 - 4.5) than that of single-alginate solutions. As pointed out in part 3.1, acidification kinetics with proteins reduced markedly from $\text{pH} \approx 5$. Thus the increase of G' for mixtures would be related to enhanced calcium release from $\text{pH} \approx 5.4$, leading to rapid reduction of electrostatic repulsions between biopolymers which would promote their self-assembly into a structured network. Besides, the slow acidification would promote self-protein interactions at pH values close to their isoelectric point (Jong et al., 2009). Thence it was hypothesized that formation of a proteins network was less-calcium dependent than an alginate network, which required solely calcium bridges. As reported elsewhere for their soy counterparts, pre-aggregated proteins could associate in a linear fashion by partial charge screening, allowing hydrophobic interaction with low amounts of calcium (10 mM). By increasing calcium amount (20 mM), the soy protein aggregates interacted with one another randomly via salt bridges established between their carboxylate groups (Maltais et al., 2008). This could explain as well in the presented case of pea protein aggregates-alginate mixtures 4-0.8 wt% that G' increased more rapidly at higher pH values with 20 mM CC than with 10 mM. Therefore the calcium availability affected greatly mixed gel strength.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

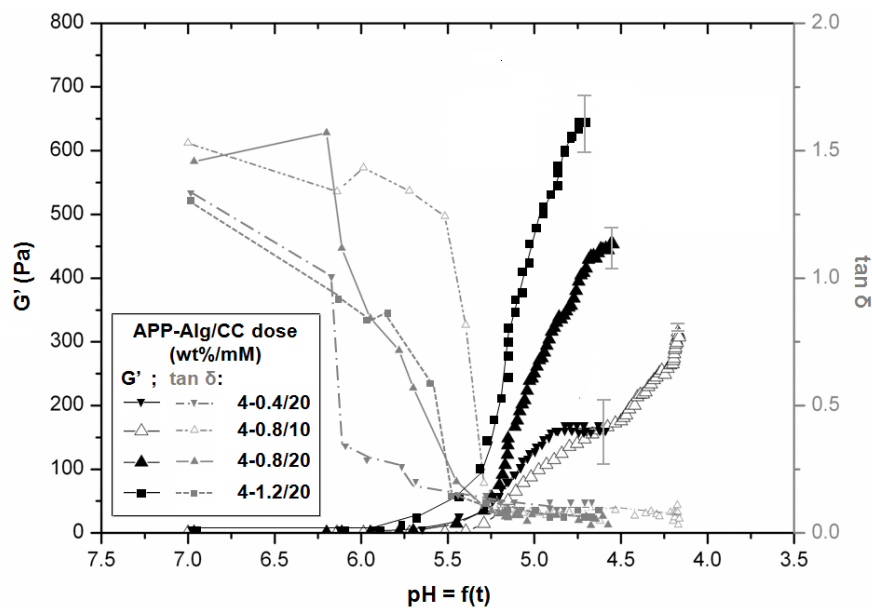


Fig. 5: Variation of storage modulus G' (left axis) and $\tan \delta (=G''/G')$ (right axis) at 20°C as a function of pH (from kinetics of acidification, Fig.2), for aggregated pea proteins (APP) - alginate (Alg) mixtures in 0.1 M NaCl, in presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM calcium carbonate (CC).

Mechanical spectra of gelled mixtures (mixtures 4-0.8/10; 20 illustrated on Fig. 6) displayed a G' modulus markedly higher than G'' in the whole frequency range. The G' and G'' moduli for gelled mixture were apparently more frequency-dependent than related single-alginate solution (Table 3b). The moduli decreased even more markedly in the low frequency-range with increasing alginate concentration of gelled mixtures, while the CC amount had a peculiar effect on the most concentrated mixture 4-1.2 wt%. By comparing Tables 3a and 3b, the difference between calculated slopes of G' and G'' for gelled mixture and related single-alginate gel tended to decrease with increasing alginate concentration; thus alginate would govern mechanical properties of the whole mixture, while the gain of elasticity for mixed gels could be due to the higher involvement of calcium bridges at 20 mM CC than at 10 mM. As remarked for single-protein solutions (part 3.2.2), if salting-out effect prevented protein gelation, the mechanical properties of gelled mixtures would exhibit a higher viscous contribution than that for single-alginate solutions. For the gelled protein-alginate mixtures, the $\tan \delta$ values at 1 rad/s were close to 0.1 for the low-concentrated mixtures 4-0.4/10; 20, while those were around $\approx 0.06-0.075$ with increasing alginate concentration. As the latter ones were close to those measured for single-alginate gels, both single-alginate gels and gelled mixtures would be similarly structured. Protein aggregates would contribute to the network formation, reinforcing overall mixed gel structure. Cross-links in-between protein

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

aggregates were effective as they contributed to the elastic modulus of the mixed gels. By leveling up alginate concentration, the reduced calcium availability for proteins would limit their random association. By its high charge density, alginate was surely a stronger Ca^{2+} cations-binder than proteins (Neiser et al., 1999). Then, slow incorporation of calcium by pre-aggregated proteins would allow their arrangement into ordered network structure (Pires Vilela et al., 2011).

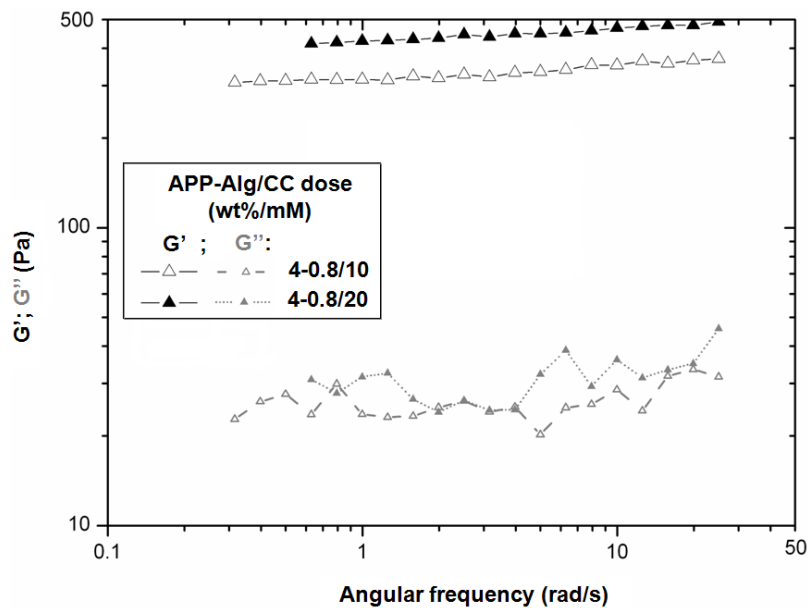


Fig. 6: Frequency-dependence at 20°C of storage modulus G' and loss modulus G'' for aggregated pea proteins (APP) - alginate (Alg) gelled mixtures at 4-0.8 wt% composition in 0.1 M NaCl, in presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM calcium carbonate (CC).

Fig. 7 summarizes final G' values related to initial biopolymer composition/CC amount. While comparing single-alginate mixtures, synergism was observed for all mixed gels. Mixed gels 4-0.4/10; 20, exhibited close final G' moduli; meaning that 10 mM CC provide was sufficient to strengthen the network. Given that wide standard deviation of G' for the gel 4-0.4/20, the highest CC amount appeared to destabilize the protein network. From mixture 4-0.8/10 to 4-1.2/10, the decline of G' would reflect lower calcium availability for both biopolymers, weakening their networks. Meanwhile at the highest CC amount, calcium was not any more a limiting factor. With regards to final G' value, the strengthening factor by comparing two-by-two single-alginate gel and mixed gel tended to decrease in intensity with increasing alginate concentration. At fixed alginate concentration, this factor was greater with 10 mM CC (G' gain between alginate gels and mixed gels of about 6-7 times) than at 20 mM

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

CC (2-3 times); higher contribution of the alginate network to the rheological properties of the gelled mixture was suggested by increasing both alginate and CC levels.

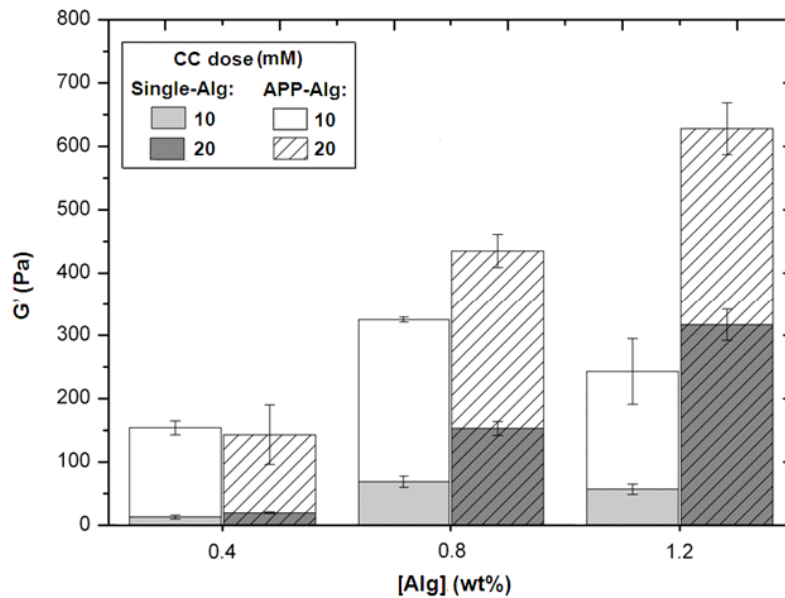


Fig. 7: Final G' values of single-alginate (Alg) gels and aggregated pea proteins (APP) - alginate gelled mixtures at 4 wt% proteins in 0.1 M NaCl, in presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM calcium carbonate (CC).

Stronger mixed gels than the sum of individual strengths of single-biopolymer solutions were described in the case of incompatible biopolymers mixtures (Tolstoguzov, 1995). If incompatibility within the mixtures was proved, an increased alginate concentration due to phase separation could not explain by itself that the mixtures were stronger than alginate gels at the same polysaccharide concentration. By segregative effects, the enrichment of each biopolymer in separated phases would increase their aggregation rate, during gelation procedure (Tolstoguzov, 1995). Thereafter, the CLSM study would help to investigate contribution of each biopolymer network to the rheological properties of the mixed gels.

3.3. Microstructure analysis by CLSM of mixed gels

A specific image analysis is usually required to characterize microstructures objectively. Each mixed gel micrograph was analyzed by co-occurrence image parameters (part 2.2.5). Then representative microstructures were plotted on a PCA-based similarity map (Fig. 8).

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

Phase separation was observed practically for all mixed gels. Two coexisting phases were evidenced, suggesting that biopolymers were in fact incompatible before the gelation takes place. Clearly, segregative effects and calcium availability affected level of aggregation of proteins and connectivity between protein-enriched microdomains (appearing in clear on the micrographs). Depending on the initial mixture compositions, the sol-gel transition kinetically entrapped various microstructures at different stages of the demixing process. As mixture gelation consisted here on an overall reduction of repulsive forces, the segregative effects would be lowered, enhancing compatibility as long as the mixture remained in the liquid state.

On Fig. 8, image parameters positively-correlated with axis 1 were homogeneity and energy, and both of them were negatively-correlated with image variance. Low variance values reflected small variations of image gray level intensities (Li, Hua, Qiu, Yang, & Cui, 2008). Besides, both high homogeneity and energy parameters characterized microstructures containing large zones of similar gray level intensity (Donato et al., 2005). Group (i) of mixtures 4-0.4/10 and 4-1.2/10 (micrographs a, e) were opposite to group (ii) of mixtures 4-0.8/10, 4-1.2/20 and 4-0.8/20 (micrographs c, c' and e'); from the right to the left of the map, the continuity of the protein-enriched phase increased. There was the passage from (i) large coexisting phases heterogeneously spread all over the micrographs to (ii) more extended and homogeneous protein network than that noticed for (i). Moreover, lower calcium availability for the former group (i) decreased protein aggregation, denoted by the smooth surface of the protein-microdomains.

The micrographs of the former group (i) evidenced bicontinuous microstructures. Considering that two networks could extend within each phase, lower continuity for both of them decreased overall gel strength (Tolstoguzov, 1995). Macroscopically, those mixtures were macroscopically heterogeneous with sedimentation of protein microdomains. Low calcium availability for mixture 4-1.2/10 did not allow sufficient strengthening of both networks, thereby microstructure was entrapped in late stages of phase separation. Similarly, the mixture 4-0.4/10 provided a weak gel, as measured by rheological measurements. On the contrary, mixtures 4-0.8/20 and 4-1.2/20 of the group (ii) were characterized by a more complex structure, exhibiting a predominant protein-enriched phase dispersing numerous small sized inclusions of alginate. For those latter mixtures, the granular surface of the protein-phase was consistent with enhanced protein aggregation attributed to strong

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

segregative effects. Moreover, a sufficient calcium feed would allow homogeneous protein aggregation within a continuous phase encompassing the whole volume of the mixture. Phase separation would be entrapped here in the early stages. Nevertheless the mixture 4-0.8/10 displayed a coarse protein aggregation. Such an aggregated-bead morphology would be associated with phase separation entrapped lately; low calcium availability at 10 mM CC for both biopolymers would delay network(s) formation. Since repulsive forces decreased during gelation, the segregative phase separation could be counterbalanced by higher compatibility between pre-aggregated proteins and alginate at low pH. For this mixture especially, local attraction between alginate chains and positive patches of protein aggregates would lead to inter-biopolymers bridging and further flocculation. This could explain that the particles appeared sticky.

On Fig. 8, the second axis was positively-correlated with contrast and negatively-correlated with correlation image parameters. From the bottom to the top of the map, there was the passage from the group (iii), with mixtures 4-0.8/10 and 4-0.4/20 (micrographs a' and c) showing loose and large protein particules to group (iv), with mixtures 4-0.8/20 and 4-1.2/20 (micrographs c' and e') exhibiting more and more entangled structures, dispersing numerous but small (dark) "objects". The heterogeneous protein network for mixture 4-0.4/20 was due to salting-out effect, as suggested by rheological data. On the contrary for mixture 4-1.2/20, gelation of small-sized alginate-enriched microdomains would occur so rapidly that they remained of small size, in favor of an extended protein network.

From the bottom to the top of the similarity map, it was worth noting that final G' moduli of mixed gels globally increased with alginate concentration and calcium availability. Furthermore the strongest mixed gels exhibited microstructure entrapped in the early stages of phase separation. The large initial size of protein microdomains could originate from the pre-treatment of pea globulins (described in part 2.1.2), giving rise to thermal protein aggregates of high molecular weight. When mixed at pH 7.2 with an incompatible biopolymer such as alginate, it was expected that the protein enriched-phase occupied a higher volume fraction than that previously displayed by their native counterparts at the same initial concentration, under non-gelling conditions (Mession et al., 2012_b). A similar phenomenon was in fact reported elsewhere for phase-separating mixtures of soy protein aggregates - κ -carrageenan (Li et al., 2008). For the aggregated pea proteins-alginate mixtures studied here, protein aggregates would associate rapidly into a continuous phase at low initial concentration,

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

apparently from 4 wt% given that CLSM micrographs. From this point, development of a stable protein network would be related to intensification of self-protein interactions, which in turn could be strengthened by excluded volume effects with increasing polysaccharide concentration. As reported by Li et al. (2008), segregative effects promoted physical interactions between soy protein aggregates and their subsequent microgelation, which modified with time the viscoelastic properties of the incompatible mixture. Similarly, the concentrated aggregated pea proteins-alginate mixture 4-1.2/20 displayed $\tan \delta$ values close to 1 at the beginning of incubation with GDL/CC, while pH was still higher than ≈ 6 (Fig. 5). Demixing rate for this mixture would be initially slow. Besides, a higher viscosity could slow down phase separation and render more difficult the homogeneous dispersion of the CC salt. The demixing would be even slower as close alginate chains confined in small microdomains could bind rapidly calcium and form locally microgels (Fang et al., 2007). It was expected that such an “early” thickening was more pronounced at the highest CC dose than at the lowest one, as testified by the reduced connectivity of the protein network from mixture 4-1.2/10 to 4-1.2/20. At low alginate level concentration, i. e. mixtures 4-0.4 wt%, rapid diffusion of calcium release in a media of low viscosity would allow rapid formation of cross-links, but their low number would not lead to a self-supporting network. This was not structured and string enough to avoid demixing process.

At sufficient calcium feed, it was hypothesized that calcium could mediate cross-links within both pre-aggregated proteins and alginate networks, and probably in-between them. The non-specific binding of calcium was previously suggested by Neiser et al. (1999), to explain higher gel strength of heat-induced BSA/Ca-alginate mixed gel than that obtained for BSA/Na-alginate filled gels. For the studied aggregated pea proteins-alginate mixtures, inter-biopolymer cross-links via Ca^{2+} cations may contribute to the mixed gels G' modulus. Therefore more investigations about calcium partitioning would be required; interestingly, calcium fluorescent labeling would allow its localization by CSLM. To get into deeply, TEM analysis bring additional information, especially on the supramolecular organization of biopolymer gels.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

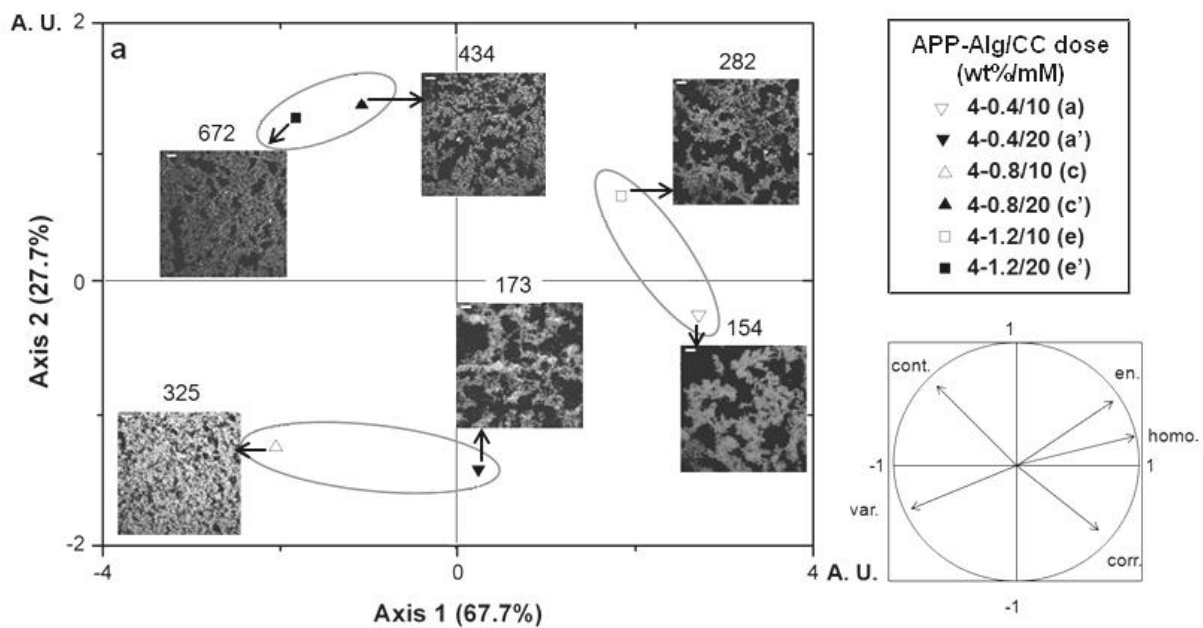


Fig. 8: Similarity map established from CLSM micrographs of mixed gels, collected after 16 h of gelation at 20°C. Mixtures in 0.1 M NaCl were prepared at 4 wt% pre-aggregated pea proteins and various alginate concentration, in the presence of 1 wt% GDL and 10 or 20 mM calcium carbonate (CC). For each, a representative microstructure was plotted. Principal components (PC) were associated with co-occurrence image parameters, described in part 2.2.5: variance (var.); contrast (cont.); correlation (corr.); energy (en.) homogeneity (homo.). The similar image textures were circled together. Values above micrographs are final G' moduli values (Pa), from Fig. 7. Scale bar is 50 μm .

3.4. Microstructure analysis by TEM

The cross section of gels obtained at 4 wt% protein concentration and increasing alginate concentrations (0-1.2 wt%) with 20 mM CC was investigated by TEM.

From Fig 9a, the single-protein gel was constituted of protein clusters without any peculiar pattern. Large solvent pores and low connectivity between clusters weakened gel structure (Beaulieu et al., 1999). Macroscopically, gel opacity was significant of a heterogeneous pre-aggregated protein network. At higher magnification level, two kinds of protein association were evidenced; a predominant particulate structure as well as a filamentous structure scarcer detected. The proto-fibril-like structures displayed filament length lower than 50 nm. It was quite surprising that both structures coexisted. Concerning soy protein cold-set gels, Maltais et al. (2008) reported that both structures were related to the aggregation mode of individual pre-aggregated proteins. From 10 to 20 mM Ca^{2+} cations

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

added, the authors depicted the passage from linear to amorphous aggregation, leading to fine-stranded and particulate gels, respectively. In the studied case of the *in situ* gelation of single-pea proteins, charge screening of thermal aggregates was probably too sharp for them to associate tightly into structured network. Now considering mixed gels, protein clusters associated into large, irregularly shaped and size-heterogeneous agglomerates (Fig. 9b-c). They should be constitutive of the protein microdomains, depicted above by CLSM. The clusters appeared as island-like groups. Nevertheless it was quite hard to state on continuity of the protein-phase given that the small thickness of the ultrathin cuts (≈ 90 nm); scanning electron microscopy should be a complementary technique to observe supramolecular arrangement at the gel surface (Maltais et al., 2005). Leveling up alginate concentration would be responsible for a quicker gel formation of the small size protein-enriched agglomerates than if they had enough time to fuse to each other into larger microdomains. Such a phenomenon was described for several thermal-induced mixed gels (Beaulieu et al., 1999; Donato et al., 2005). The authors reported in fact a weakening of the gel structure at high (gelling) polysaccharide concentration. However, it has not been encountered in the present study, given that the highest G' modulus value was reached with the concentrated mixture 4-1.2/20. Rapid gelation of protein microdomains would decrease connectivity of the protein network. Nevertheless mixed gel strengthening could not be solely explained by the contribution of the alginate network, even if the polysaccharide concentration increased by segregative effects. This appears as the first clue that both protein and alginate networks were entangled, especially when phase separation was entrapped in the early stages by gelation.

At higher magnification, a predominant amorphous assembly of pre-aggregated proteins during the gelation process was noticed (Fig. 9a). For mixture 4-0.4/20, the atrophied and dense bundle aspect of the assimilated proto-fibril structures would reflect protein over-aggregation, attributed to salting-out effect with an excess of calcium (Fig. 9b). With 1.2 wt% alginate, extended proto-fibril structures ($\gg 100$ nm) for mixture 4-1.2/20 could be exposed locally at the surface of the protein agglomerates (Fig. 9c). Those were as well observed in zones of low density within protein agglomerates, meaning that they did not have specific localization. Meanwhile both their small length and overall low number would not favor high number of cross-links in-between them. Since proto-fibril structures would display higher surface charge than more compact agglomerates, it could confirm that lower calcium

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

availability for the pre-aggregated proteins in the presence of 1.2 wt% alginate reduced locally their random aggregation during gelation.

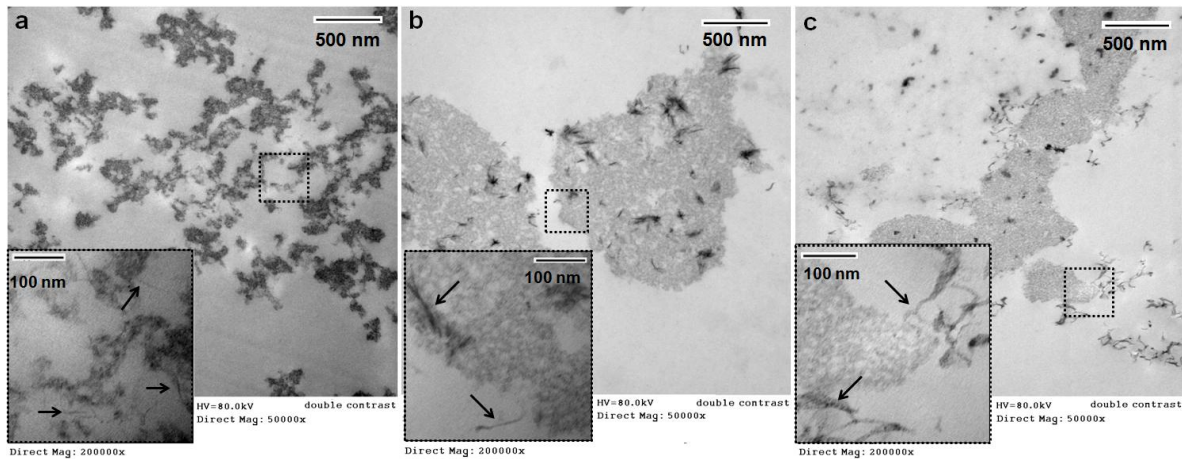


Fig. 9: TEM micrographs of cross-section of (a): single-pre-aggregated pea proteins gel 4/20; proteins - alginate mixed gels (b): 4-0.4/20 and (c): 4-1.2/20, after 16 h of gelation at 20°C. Mixtures were prepared in 0.1 M NaCl, with 1 wt% GDL and 20 mM CC, while 0.35 wt% GDL was used for the single-protein gel. Proteins (in dark) were stained by lead acetate. The dotted square indicated magnified zone of interest. Arrows pointed proto-fibril-like protein structures.

Thereafter PATAg test was performed to stain the alginate network (Fig 10) (Hall, 1991). Protein microdomains were not stained here and appeared in faint gray. Surprisingly, the single-protein gel 4/20 showed a few filaments punctuated by dark spots, positively stained (data not shown). This could be attributed to residual carbohydrates which were co-extracted with proteins, as detected previously by another staining method (Mession et al., 2012_b). For mixed gels, the stained alginate chains surrounded in appearance the protein-agglomerates, forming a sparse and open network. The alginate network consisted of studded particles for mixture 4-0.4/20, (Fig. 10a) while it exhibited more likely elongated rods for mixture 4-1.2/20 (Fig. 10b). A low alginate concentration with an excess of calcium in the former mixture would give rise to a dense alginate network; chains associated randomly at high saturation of Ca^{2+} cations-binding sites. For mixture 4-1.2/20, a lower saturation of these latter was expected as a result of alginate chains over-aggregation reduction as they remained more repulsive, slowing down rearrangements in-between them during gelation. Consequently this would lead more likely to aligned structures within the alginate network (Jørgensen, et al., 2007). Calcium diffusion towards binding sites of either pre-aggregated proteins or alginate clearly affected their aggregation behavior during gelation, also the local morphology of their respective networks. As suggested by several micrographs at high magnification (Fig.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

9b, second micrograph), some “anchoring points” were established between the alginate chains and the surface of the protein agglomerates, due to the non-specific binding of calcium. Such salt bridges were assumed to reinforce cohesiveness between both networks, which developed in separated phases. Number of entanglements between both networks would increase when alginate chains cross-linked with proto-fibril structures. This would be particularly enhanced in the case of the gel 4-1.2/20 (Fig. 10b, second micrograph). This would underpin the key role of calcium with regards to the mixed gels synergism. Connectivity between protein agglomerates would be as well raised up by alginate chains bridging of agglomerates close to each other (Figure 10b, third micrograph). These findings strongly suggest that both networks are indeed interdependent, despite the fact they occupied separated phases.

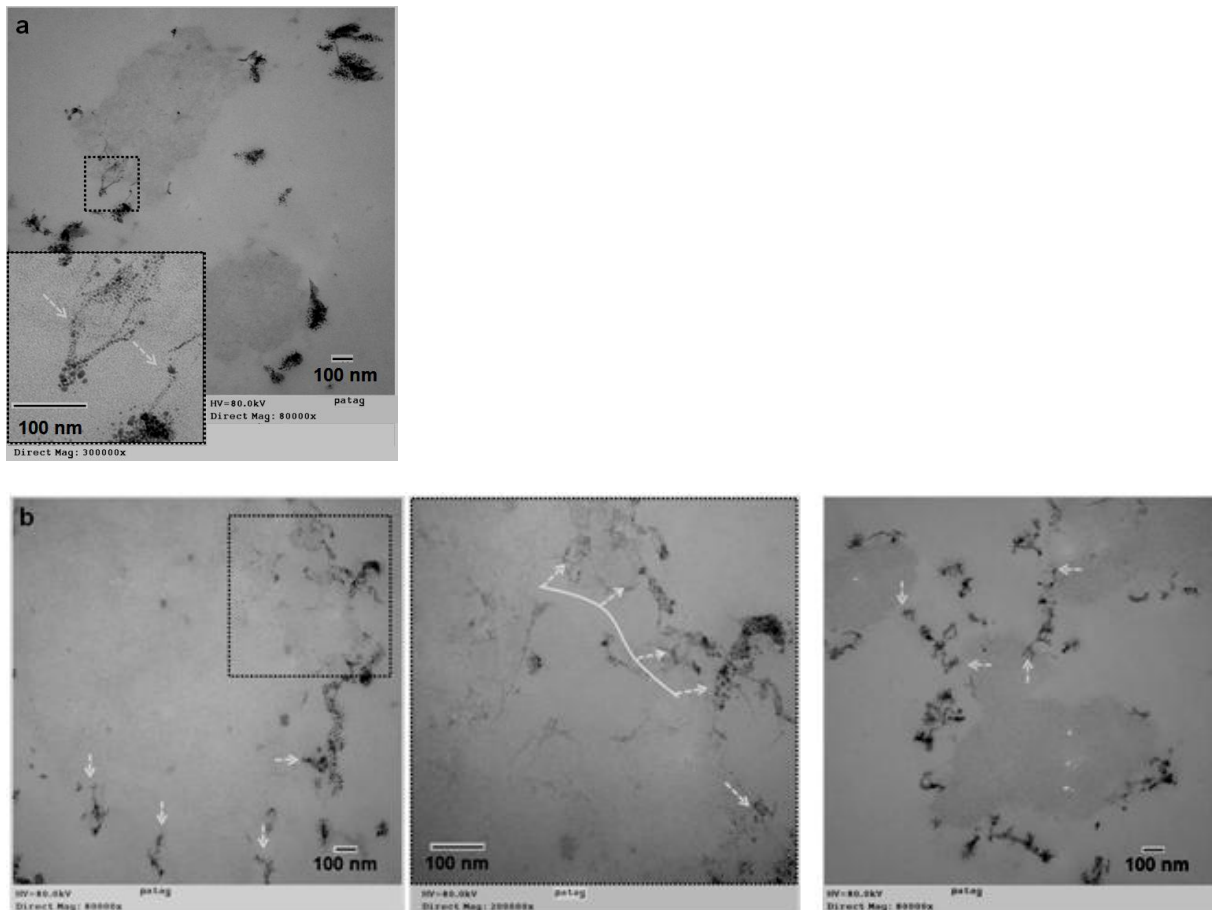


Fig. 10: TEM micrographs of pre-aggregated proteins - alginate mixed gels of composition (a): 4-0.4/20 and (b): 4-1.2/20. Mixtures were prepared in 0.1 M NaCl, with 1 wt% GDL and 20 mM CC. Alginate (in dark) was stained according to the PATAg test, while unstained proteins appeared in light grey. The dotted square indicated magnified zone of interest. Arrows pointed possible “anchoring points” between protein and alginate.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

4. Conclusion

This study investigated a cold-set gelation procedure of thermal pre-aggregated pea globulins mixed with alginate, by *in situ* release of calcium. Different tools were employed in the attempt to characterize the system at several scales. Alginate gelation was obviously calcium-dependent, while concomitant acidification and calcium release rather induced coagulation of single-pre-aggregated proteins. When protein and alginate were mixed together, the gain of gel strength was significant of synergism attributed to incompatibility between dissimilar biopolymers. Indeed segregative effects led to biopolymer enrichment in separated phases, promoting self-biopolymer attractive interaction. An optimal calcium feed was assumed to allow salt bridges to settle in between pre-aggregated proteins.

The strongest mixed gels, even stronger than single-alginate gels, were encountered for increasing alginate concentrations in combination with suitable calcium feed. While alginate apparently governed gelation of mixed gels, microstructure data revealed that protein particles assembled into large agglomerates, constitutive of extended microdomains mottled by alginate-enriched inclusions. It was hypothesized that entangled networks strengthened mutually, originating from the non-specific binding capacity of calcium. In fact calcium could establish locally cross-links in-between both networks, leading to interdependent structures. Therefore the effect of calcium release on gelation appeared greater than acidification of the media operated by GDL hydrolysis. Further studies on the pea globulins pre-aggregation step should be conducted; by designing various protein aggregates, both the phase behavior and the gelation processes would be greatly modulated, with the aim to favor networks entanglements stabilized by salt-bridging.

Acknowledgements

Financial support from the Ministère de l'Economie, des Finances et de l'Industrie (Direction Générale des Entreprises) of the French Government and Le Grand Dijon are gratefully acknowledged. We would like to thank particularly humble and helpful people we worked with, also Y. Roche, T. Karbowiak and J. Lherminier for the fruitful discussions we had.

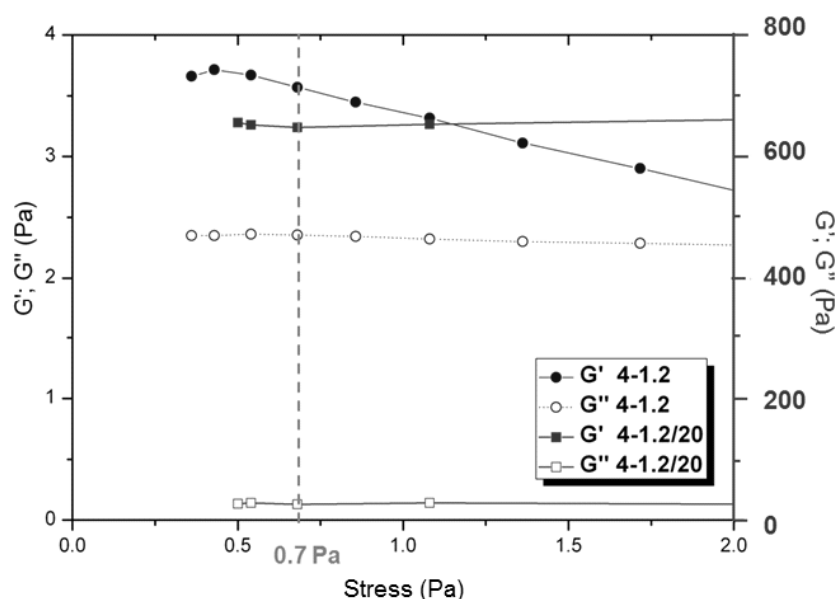
References (*cf partie Références bibliographiques en fin du présent document*)

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

5.2.3. Données complémentaires: *supporting information*

5.2.3.1. Domaine de linéarité des mesures en rhéologie dynamique - *linear viscoelastic region of the measurements*

An initial stress of 0.7 Pa for both time-sweep and frequency-sweep measurements was used. It was checked that stronger and stronger (high final G' value) (gelled) material presented an increasingly linear domain width. On **additional Fig. 11** is given an example of a stress-sweep test for a protein-alginate mixture of composition 4-1.2 wt% (**not yet in gelling conditions**). The compromise between non gelled and gelled mixture was to determine a constant stress value applied, which was **initially fixed at 0.7 Pa for all the samples listed in Table 1**.



Additional Fig. 11: variation of viscoelastic moduli G' and G'' at 20°C as a function of the stress applied on aggregated pea proteins-alginate mixtures of initial composition 4-1.2 wt%, in 0.1 M NaCl. Two mixtures were tested: **under non-gelling conditions** (circles+line, **left axis**) and **after gelation** (squares + line, **right axis**) in presence of 1 wt% GDL and 20 mM CC, as indicated on the legend. Solid and open symbols: G' and G'' moduli, respectively.

5.2.3.2. La gélification des protéines seules - *gelation of single-protein solutions*

It was stated above in part 3.2.2 “Single-pre-aggregated pea proteins solutions” that an amount of GDL at 1 wt% was too much to allow gelation. Therefore three concentrations of the pre-aggregated proteins were tested, at 4; 6 and 8 wt%, in the presence of 0.35; 0.4

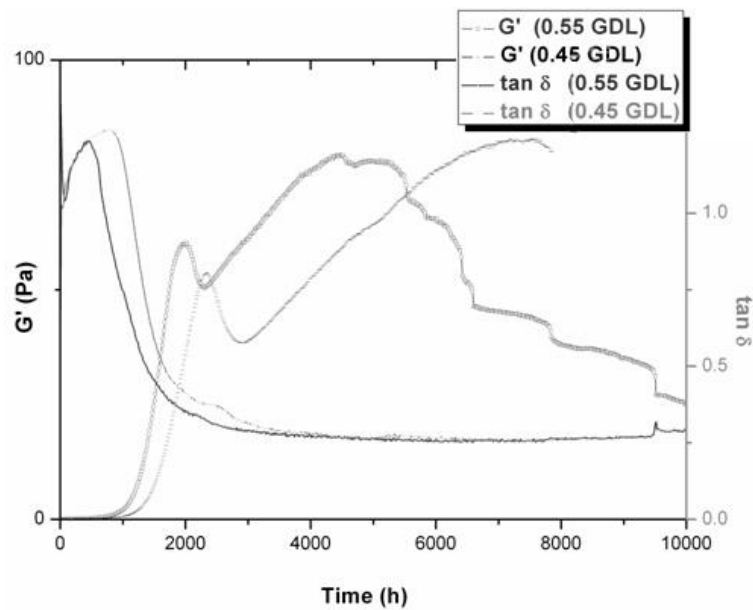
5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

and 0.45 wt% GDL, respectively, and 20 mM CC. This gave rise to weak gels, as they displayed low final G' value ($\ll 100$ Pa). No gel was obtained with 10 mM CC, probably attributed to the more abrupt pH drop than that for 20 mM CC.

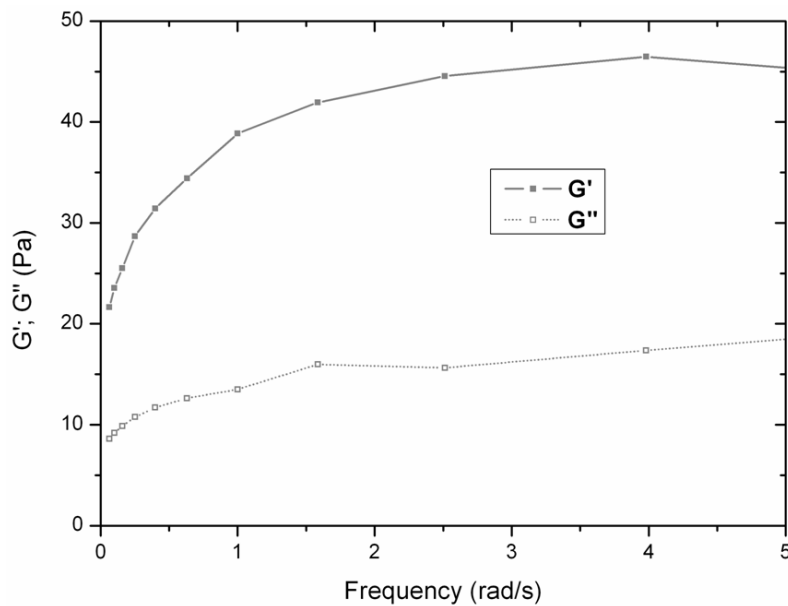
The G' evolution with incubation time of single-pre-aggregated protein solutions at 8 wt% concentration, in the presence of 20 mM CC and either 0.45 wt% (in gray) or 0.6 wt% GDL was presented on the **additional Fig. 12**. Both gelation curves showed that G' modulus increased steeply from ≈ 1200 s then dropped slightly a first time around 2000 s. Thereafter G' showed a second increase in both cases, slower with 0.45 than with 0.6 wt% GDL, until the modulus reached around ≈ 80 Pa. However the G' modulus started to decline from 5000s in the case 0.6 wt% GDL. In this latter case, this was attributed to rapid charge screening and salting-out effect by acidification/calcium release, while in the former case a lower amount of GDL reduced acidification rate and most probably prevented from protein precipitation. Nevertheless, the gel produced was weak; the final $\tan \delta$ value (≈ 0.25) in the case of the protein gel obtained with 0.45 wt% GDL would reflect that some cross-links between proteins were non effective, as they contributed to the viscous component (G'' modulus) of the gelled material (Campbell, Gu, Dewar, & Euston, 2009; Renkema, & Van Vliet, 2004). Therefore protein coagulation was suggested to occur rather than a typical gelation process (Sun et al., 2010).

In the presence of 0.45 wt% GDL and 8 wt% proteins, it was checked that the pH decreased to ≈ 6.3 after 1200 s of incubation. This time coincided apparently with the gel point (onset of G' dramatic increase). However the pH decrease practically stopped at this pH and remained around values of ≈ 6.3 -6.5 for 2 h of incubation. Thereafter the pH increased very slowly with time. This was attributed to protein binding calcium, shifting the equilibrium between CC and free Ca^{2+} , thus enhancing release of carbonate ions. It explained why the G' evolution on add. Fig. 1 was not represented as a function of pH. The pH was close to ≈ 7 after 14 h incubation at 20°C and did not evolve with time anymore. Therefore the calcium release was strongly reduced with time, as the carbonate ions (in excess) had a pronounced counter-acidifying effect. In this case, with a limited amount of GDL, calcium availability was as well limited and the protein network could not strengthen markedly.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid



Additional Figure 12: evolution of G' modulus and $\tan \delta$ with time for single-pre-aggregated pea proteins at 8 wt%, at 20 °C and in 0.1 M NaCl and in the presence of two GDL levels – i.e. 0.45 and 0.55 (as specified, in wt%) and with 20 mM CC.



Additional Figure 13: Frequency-dependence at 20°C of storage modulus G' and loss modulus G'' for single-aggregated pea proteins gelled solution at 8 wt% composition in 0.1 M NaCl, in the presence of either 0.45 or 0.6 wt% GDL and 20 mM calcium carbonate (CC).

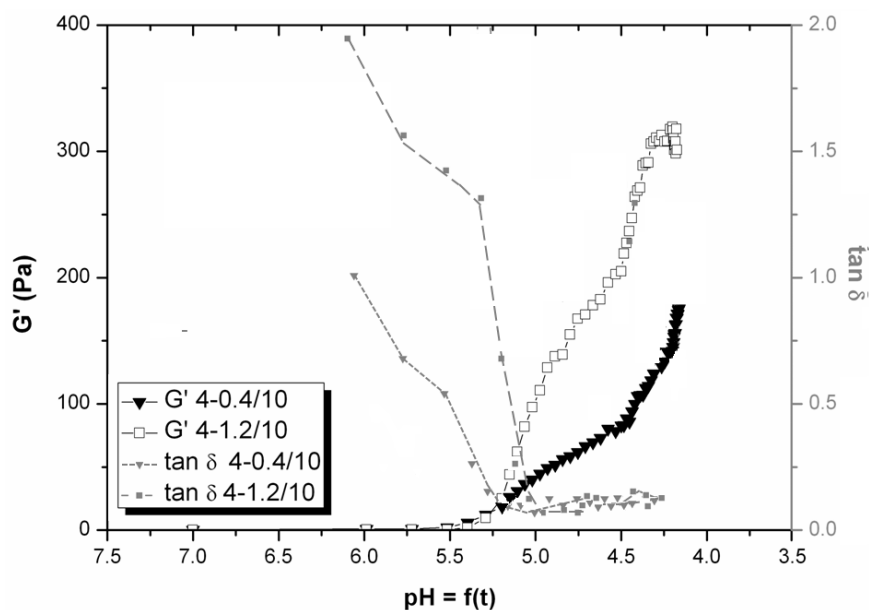
To complete, the mechanical spectra on **add. Fig. 13** showed strong frequency-dependence of both moduli (especially the elastic modulus), which decreased in the low-frequency range. This confirmed that the protein gel contained numerous imperfections, with

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

weak cross-links in-between aggregates and low connectivity within the protein network (Sun et al., 2010).

5.2.3.3. Décalage entre détection de la transition sol-gel et véritable départ de la gélification – a « decay » between sol-gel transition detection and onset of gelation

On the **additional Fig. 14** were given the G' and $\tan \delta$ evolution of mixtures 4-0.4/10 and 4-1.2/10 (not presented in the **Manuscript 2** above). This completed the **Fig. 5** above in **part 3.2.3**. For protein-alginate mixtures, the G_p was detected in a pH 5.4-5.7, as listed on Table 2b. It was also added with the gelation profile curves $\tan \delta$ evolution during gelation. Thus it could be noted a “decay” between $\tan \delta$ reaching values under 1 (detection of the sol-gel transition by the rheometer) and the strengthening of the gel ($G' \gg G''$, considered as the “true” onset of gelation) for mixtures 4-0.4/20 and 4-1.2/20.



Additional Fig. 14: Variation of storage modulus G' (left axis) and $\tan \delta (=G''/G')$ (right axis) as a function of pH (from kinetics of acidification, Fig.2), at 20°C, for aggregated pea proteins (APP) - alginate (Alg) mixtures 4-0.4/10 and 4-1.2/10 in 0.1 M NaCl, in the presence of 1 wt% GDL and 10 mM calcium carbonate (CC).

Such “decay” was not observed for the mixtures prepared at 10 mM CC, while it was more evident at 20 mM CC. This would possibly illustrates phase separation stages at which gelation kinetically entraps, either occurring in the early stage (strong segregative effects-

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

entangled microstructure, e. g. mixture 4-1.2/20) or in the late stage (bicontinuous system with larger coexisting phases than previously, e. g. mixture 4-0.4/20).

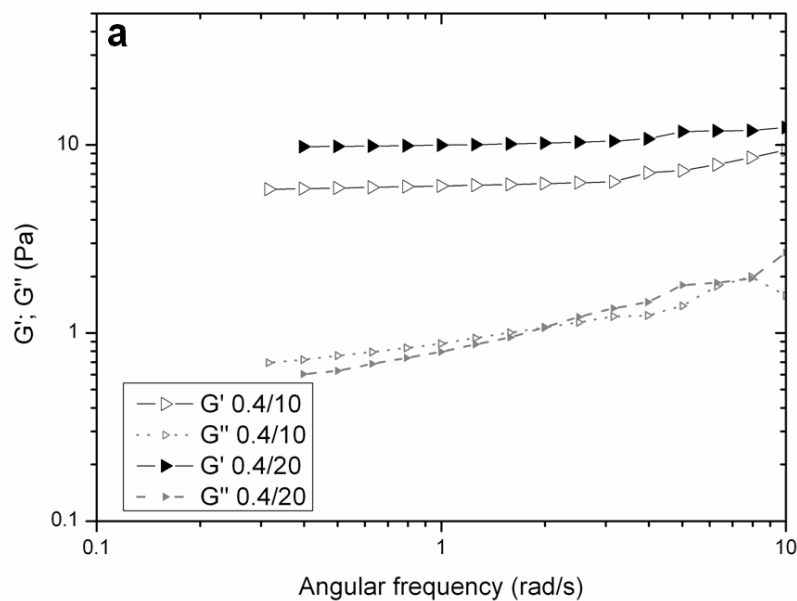
*Phase separation was due to concentration fluctuation of one biopolymer in the neighborhood of dissimilar biopolymers. Under non-gelling conditions, demixing phenomenon gave rise to larger microdomains, also growing up with time factor (Schorsch et al., 1999). This would occur until each biopolymer (protein and alginate) occupied two well-separated phases. Long time allowing phase separation was detrimental for mixed gels texture because of a lack of cohesiveness between separated phases (Kuhn, Cavallieri & Cunha, 2011). Besides, it was noted that a continuous protein-phase dispersing alginate, where an extended network could develop during gelation led to the strongest gels. It appeared that such microstructure presented finally entangled networks. It was interesting to note that despite repulsive forces which decreased with gelation time, all the micrographs plotted on **Fig. 8** above exhibited phase separation. Meanwhile it was expected that lower repulsions between protein aggregates and alginate enhanced compatibility. Consequently micrographs would not evidence coexisting phases, rather homogeneous fluorescence brought by proteins spread all over the observed sample. This was not the case here; this meant that demixing took place immediately within mixtures, while they were still in a liquid state. The raise of viscosity due to alginate chains binding rapidly alginate would decrease rapidly demixing rate. For the most concentrated mixture investigated, the early G''/G' crossover for mixture 4-1.2/20 was related to the protein-phase which could jellify rapidly by strong segregative effects, probably induced by a high level of alginate (1.2 wt%). There, self-protein interaction would be promoted by other-concentration effects, favoring their rapid gelation. This phenomenon would confirm that phase separation was entrapped quickly, as the mixture was rapidly in an intermediate sol-gel state.*

5.2.3.4. Spectres mécaniques: complément d'informations – Mechanical spectra: complementary data

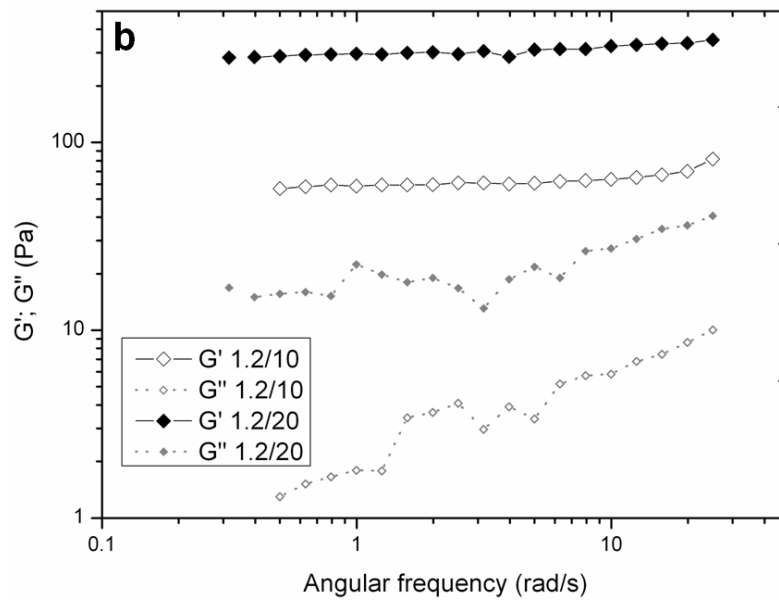
*Below are presented on **add. Fig. 15** the mechanical spectra for the single-alginate solutions 0.4/10; 20 and 1.2/10; 20. This completed the **Fig. 4** of the **part 3.2.1** in the **Manuscript 2**. It appeared that both moduli G' and G'' were frequency-dependent, as they decreased in the low-frequency range. Viscoelastic gels were produced. The G'' modulus*

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

showed a stronger frequency-dependence at 20 mM than at 10 mM. The enhanced frequency dependence of G' and G'' moduli, for alginate gels prepared at 20 mM CC should be attributed to the (rather) random aggregation of chains; therefore some cross-links would be non-effective as they did not contribute to the network elasticity. A low calcium feed at 10 mM was rather limited to produce strong alginate gels. However 10 mM CC was sufficient to produce an alginate gel, given that G' remained higher than G'' in the whole frequency range and final $\tan \delta$ values were generally lower than 0.05. By increasing alginate concentration, polymer chain mobility decreased for reasons of enhanced viscosity. Rapid dimerization of chains via calcium led to random aggregation at the beginning of the incubation. For longer incubation time with both GDL/CC, the network would rearrange by itself so as to ensure maximum occupancy of alginate-binding sites by calcium cations. Therefore “dynamic structures of alginate gels” were produced; gelation time increased with alginate concentration, giving rise to stable network.

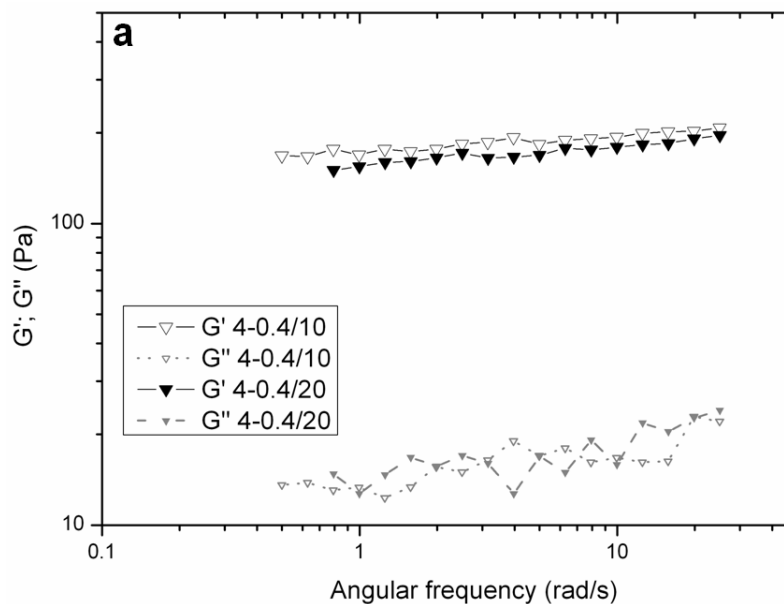


5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

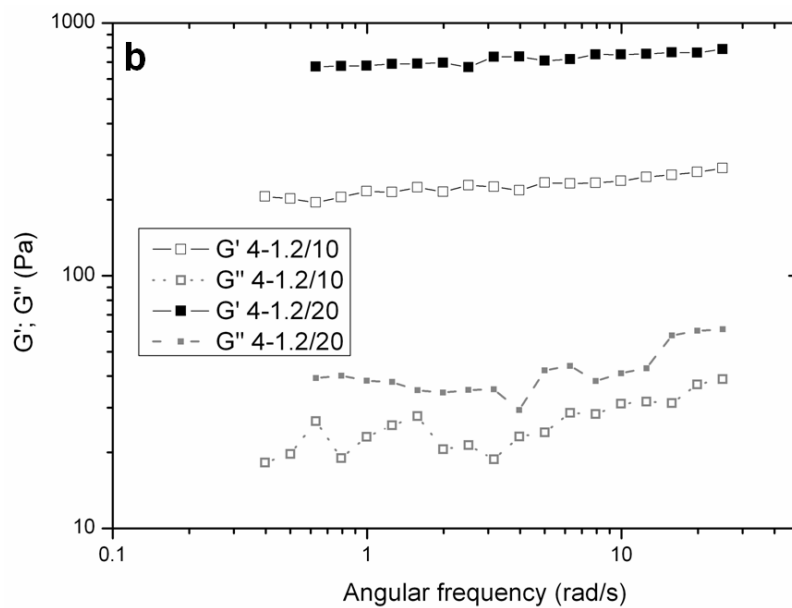


Additional Figure 15: Frequency-dependence at 20°C of storage modulus G' and loss modulus G'' for single-alginate solutions in 0.1 M NaCl, in presence of 1 wt% GDL and 20 mM calcium carbonate. Compositions were (a): 0.4/10; 20; (b): 1.2/10; 20 (see Table 1 in v2).

Moreover, mechanical spectra of protein-alginate mixed gels 4-0.4/10; 20 and 4-1.2/10; 20 were presented on *add. Fig. 16*.



5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid



Additional Figure 16: Frequency-dependence at 20°C of storage modulus G' and loss modulus G'' for aggregated pea proteins-alginate mixtures in 0.1 M NaCl, in presence of 1 wt% GDL and 20 mM calcium carbonate. Compositions were (a): 4-0.4/10; 20 wt%; (b): 4-1.2/10; 20 (see Table 1 in v2).

Both G' and G'' moduli were as well frequency-dependent, decreasing in the low-frequency range (lines 472-494, pp. 19-20). The frequency-dependence was apparently more pronounced at 20 mM CC than in the case of related single-alginate solutions. Slopes from mechanical spectra were summarized in **Table 3b**. As the G' and G'' slopes showed the same tendency than those of related single-alginate solution (apparently more pronounced with increasing alginate concentration, and despite higher final G' for mixed gels than alginate ones) (**Table 3a**), it was suggested that mixed gels would adopt mechanical properties of alginate. The protein aggregates - which were unable to form a structured network alone with the *in situ* release of calcium tested in our study - would contribute to the reinforcement of the mixed gel network structures; otherwise mixed gels would have displayed a lower difference between G' and G'' ($\tan \delta$ values >0.1) than in the case of alginate. This was not the case here, since final $\tan \delta$ values were in the range of $\approx 0.05-0.08$, close to values for alginate. Both biopolymers would form gelled network.

The gain of elasticity for mixed gels compared to single-alginate gel solutions (see **Fig. 7** of the **part 3.2.3** in the **Manuscript 2**) would be attributed to enrichment in separated phases by incompatibility. Moreover, entanglements between networks could be explained by

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

the non-specific binding capacity of calcium, even in-between protein aggregates and alginate chains.

5.2.4. Autres cas de gels mixtes: concentration en protéines et quantité de CC variables

D'autres gels ont été étudiés afin de balayer un large domaine de compositions initiales. Dans le **Manuscrit 2**, ont été traités des gélifications de mélanges protéines pré-agrégées – alginate, la concentration protéique restant fixe à 4% (m/m) et celles d'alginate variable (0.4-1.2 % - m/m). Ici seront abordés des gels à concentration fixe en alginate (0.8 % - m/m) et variable en protéines. Nous ne présenterons ci-après que les valeurs d'élasticités après gélification, l'étude comparée de microstructure comme il l'a été conduit en partie 3.3 du **Manuscrit 2**, et enfin les spectres mécaniques.

5.2.4.1. Données de rhéologie

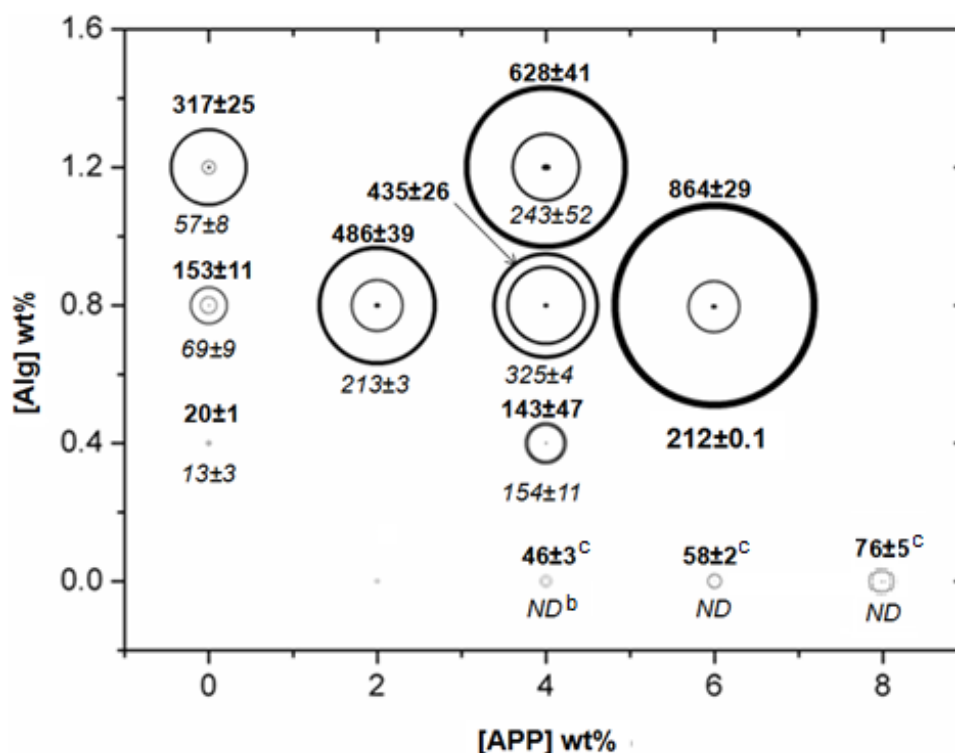
En premier lieu, il est à noter que les courbes de gélification des mélanges considérés montraient un comportement similaire à ce qui a été décrit en partie 3.2.3 du **Manuscrit 2**, à savoir que les quatre mélanges considérés montraient une augmentation de G' à partir d'un pH de l'ordre de l'ordre de 5,2-5,4. Pour ce qui est de l'évolution en parallèle des valeurs de $\tan \delta$ au cours de la gélification, il a été noté :

- (i) Pour les mélanges les moins concentrés 2-0,8/10 ; 20 et pour le mélange concentré en biopolymères mais selon toute vraisemblance déficient en calcium 6-0,8/10, il n'a pas été observé de décalage flagrant entre augmentation brusque de G' consécutive à la diminution rapide de $\tan \delta$ sous des valeurs de 1 et se stabilisant autour de 0,06.
- (ii) Pour le mélange concentré 6-0,8/20, il a été observé un même décalage qui avait été mis en évidence plus haut pour le mélange 4-1,2/20.

La **Figure 5.1** résume les valeurs finales d'élasticité obtenues pour l'ensemble des gels étudiés. Il reste à discuter un balayage en concentrations de protéines, celle de l'alginate étant fixée à 0,8 % (m/m) dans ce qui suit. Une augmentation de la concentration en protéines de 2

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

à 6 % (m/m) résultait en des gels plus forts. Il peut être supposé - si l'on considère le diagramme de phase qui a été établi hors conditions de gélification dans la partie 4.2 du **Manuscrit 1** - qu'une augmentation de la fraction volumique en protéines offrait un espace plus vaste en solution pour le développement de son réseau. Ainsi une plus grande continuité de la phase protéique d'emblée disperserait davantage les microdomaines enrichis en alginate, réduisant la connectivité entre ceux-ci et limitant ainsi l'extension du réseau polyosidique. Néanmoins le gain d'élasticité entre les gels 2-0,8/20 et 6-0,8/20 passait du simple au double ; ceci traduirait que la contribution à l'élasticité finale du gel mixte *a priori* de plus en plus marquée du réseau protéique pour des concentrations en protéines croissantes resterait modérée. Par contre, une quantité de 10 mM de CC semblait insuffisante pour le renforcement des réseaux dans le cas du gel concentré 6-0,8/10.



^a Les gels obtenus sont symbolisés par un cercle, dont le diamètre est fonction de la valeur G' finale; les valeurs en italiques sous le cercle et en gras au-dessus de chaque cercle ont été respectivement obtenues en présence de 10 ou 20 mM CC initialement. ^b non déterminé. ^c Gels protéiques obtenus avec une quantité moindre de GDL que dans les autres cas : les gels à 4; 6 et 8 % (m/m) ont été obtenus avec 0,35; 0,4 et 0,45 % GDL et 20 mM CC.

Figure 5.1: valeurs finales du module G'^a (Pa, moyenne \pm écart type) de gels à froid obtenus à partir de solutions d'alginate (Alg) seul, de protéines globulaires de pois pré-agrégées (APP) et de mélanges mixtes protéines – alginate. Les mesures ont été effectuées après ≈ 16 h de

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

gélification à 20 °C, en présence de 1 % (m/m) GDL et 10 ou 20 mM de carbonate de calcium (CC).

Les spectres mécaniques des gels mixtes considérés sont mis en évidence à la **Figure 5.2**.

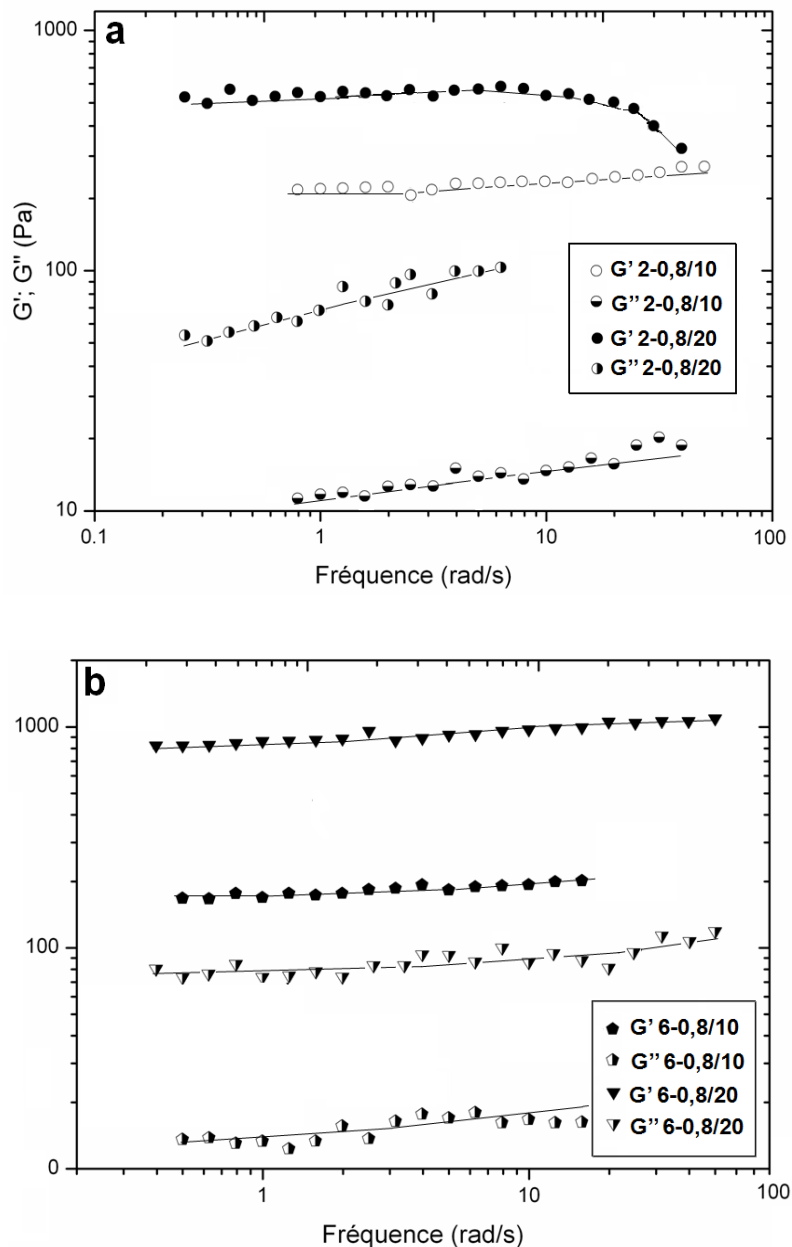


Figure 5.2 : Spectres mécaniques à 20°C en fin de gélification (≈ 16 h) pour des gels mixtes de globulines de pois pré-agrégées (APP) et d'alginate (Alg), dans 0.1 M NaCl, pH 7.2. Ceux –ci ont été obtenus à partir de différentes compositions initiales APP-Alg (exprimées en couple de concentrations % - m/m), en présence de 1% (m/m) de GDL et soit de 10, soit de 20 mM de carbonate de calcium (CC).

Les spectres mécaniques ci-dessus montrent un comportement analogue à ce qui a été décrit dans le **Manuscrit 2, partie 3.2.3** ainsi que dans la partie **5.2.3.4** : les deux modules G'

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

et G'' diminuent avec la fréquence (**Figure 5.2a**). Cela reflétait un comportement similaire à des gels d'alginate, ainsi le réseau polyosidique gouvernerait les propriétés rhéologiques des mélanges 2-0,8/10 ; 20. Par comparaison, les pentes calculées à partir des spectres obtenus pour les gels 4-0,8/10 ; 20 étaient plus faibles que pour les gels 2-0,8/10 ; 20 ; de ce fait une augmentation de la concentration en protéines réduirait la prédominance du réseau d'alginate. Pour des gels plus concentrés (**Figure 5.2b**), (ii) les deux modules G' et G'' montraient une moindre dépendance dans le domaine des basses fréquences (< 10 rad/s). Une dépendance à la fréquence pour des gels de biopolymères est signe qu'ils présentent des imperfections (Sun et al., 2010). Un matériau purement élastique présente des modules indépendants de la fréquence appliquée (Grillet et al., 2012 ; Sun et al., 2010). Des gels viscoélastiques sont obtenus dans tous les cas, néanmoins plus élastiques que les gels d'alginate ou les coagulas obtenus avec les globulines pré-agrégées seules (voir **partie 5.2.2, sous-partie 3.3.1**).

Une moindre saturation des sites de liaison du calcium est fortement suggérée, étant donné l'effet de viscosité marqué et la dispersion du carbonate de calcium rendue plus compliquée (Fang et al., 2007). Ceci pourrait expliquer partiellement les « imperfections » des gels mixtes signifiées par les spectres mécaniques. Pour le gel mixte 6-0,8/20, une concentration supérieure en APP devrait diminuer la disponibilité en calcium pour l'alginate. De plus, les effets ségrégatifs conduisaient à des microdomaines gélifiés d'alginate plus petits et davantage dispersés, réduisant probablement la prédominance du réseau d'alginate sur les propriétés mécaniques du gel mixte. Pour le gel 6-0,8/10, la quantité en défaut de calcium affaiblissait à la fois le réseau d'alginate et réduisait l'agrégation protéique, donnant lieu à une séparation de phase plus marquée avant qu'elle soit bloquée par gélification du mélange (voir ci-après). Les gels mixtes de plus grande valeur d'élasticité du gel seraient donc obtenus pour un réseau protéique étendu, dispersant des microdomaines d'alginate et figeant rapidement la séparation de phase. Même si les spectres mécaniques reflètent un caractère viscoélastique des gels mixtes, une force de gel supérieure aux gels d'alginate est bien la preuve d'une synergie entre les réseaux formés, et cela ne serait permis que par le rôle pontant du calcium.

5.2.4.2. Données de microstructure

Une autre ACP a été effectuée pour les gels mixtes protéines pré-agrégées - alginate à 2 ; 4 et 6-0,8/10 ; 20, comme illustrée par la **Figure 5.3**.

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

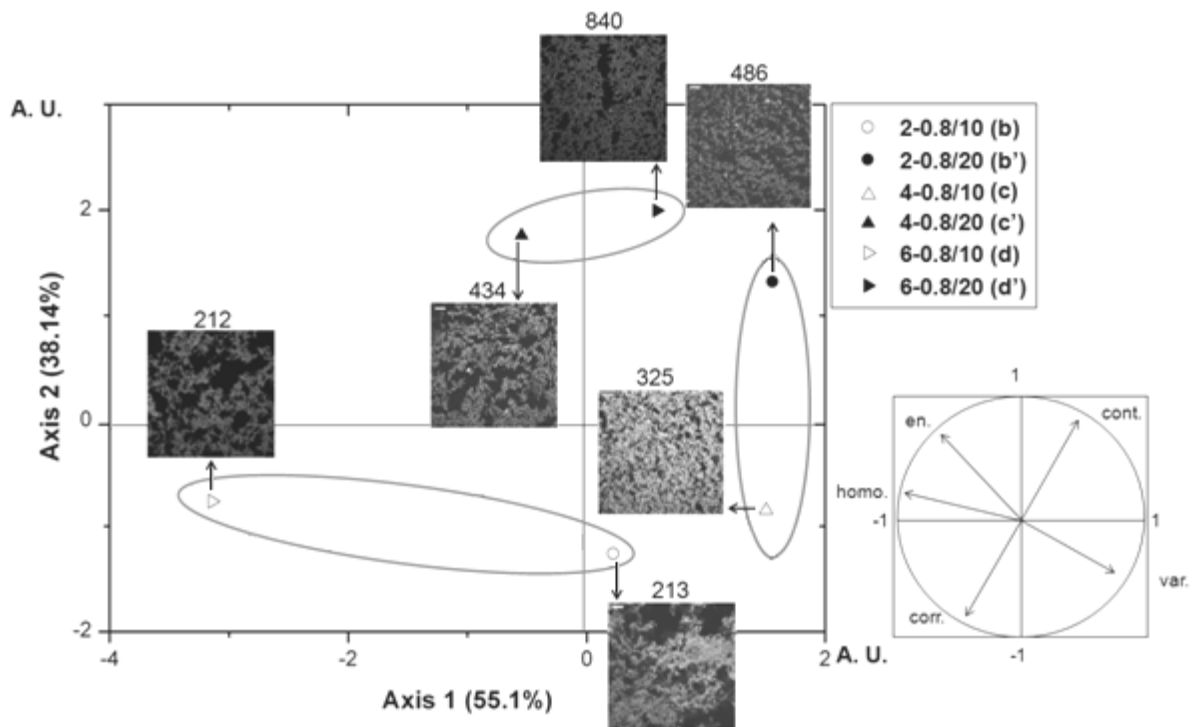


Figure 5.3: Carte factorielle établie à partir des clichés obtenus par MCBL. Les composantes principales (axes 1; 2) sont associés avec les paramètres de cooccurrence d'image : “var.”: variance normalisée ; “cont.”: contraste; “corr.”: corrélation; “en.”: energy ; “homo.”: homogénéité (voir texte). Les mélanges présentant des textures d'image sont entourés. Les valeurs au-dessus des clichés sont les valeurs finales d'élasticités G' finales (Pa), d'après la **Figure 5.2**.

L'axe 1 était corrélé positivement avec les paramètres de variance d'image, négativement avec les paramètres d'homogénéité et d'énergie. De gauche à droite de la carte, il y avait le passage (i) du gels mixte 6-0.8/10 (cliché d) montrant de larges zones attribuées aux phases coexistantes au groupe (ii) de gels 2-0.8/20 and 4-0.8/10 (clichés b', c), présentant une phase protéique bruitée et grossière. Pour ce groupe, il a été suggéré qu'une faible disponibilité en calcium à 10 mM CC était similaire à une diminution de la concentration en protéines, qui allait de pair avec une perte de connectivité entre les particules protéiques. Egalement ces mélanges témoigneraient d'une séparation de phase bloquée tardivement par gélification. En outre, il peut être évoqué que le niveau d'incompatibilité diminuait au fur et à mesure que l'acidification du mélange s'opérait (d'où une diminution progressive des répulsions électrostatiques entre biopolymères) Probablement des complexes inter-biopolymères se formaient, ne participant à aucun des deux réseaux. Il en résulte un effet antagoniste envers l'élasticité finale du gel, étant donné que la concentration en biopolymères véritablement gélifiants diminuait (Tolstoguzov, 1995). Ceci est à mettre en parallèle avec la

5. Un système incompatible de globulines de pois pré-agrégées-alginate; entre séparation de phase et gélification à froid

présence d'hétérogénéités macroscopiques (assimilables à des coagulats) prises dans la masse du gel, et la valeur finale de $\tan \delta$ de l'ordre de $\approx 0,11$ pour le gel 2-0,8/10. La microstructure du mélange 6-0,8/10, peut être comparée à celle des mélanges précédemment discutés 4-1,2/10 and 4-0,4/10 ; une structure bicontinue avec une phase polysidique étendue coexistant avec un réseau protéique lâche signifiant une faible aggrégation des protéines.

Le deuxième axe est corrélé positivement avec le paramètre d'image corrélation, et négativement avec contraste. Du bas vers le haut de la carte factorielle, le deuxième axe séparait les gels mixtes respectivement à 10 et 20 mM CC. Il y avait passage du groupe de mélanges (iii) 4-0,8/10 et 6-0,8/10 (clichés c et d) au groupe (iv) de mélanges 4-0,8/20 et 6-0,8/20 (clichés c' et d'); dans le même sens, les valeurs finales d'élasticité augmentaient. La microstructure d' reflétait une phase protéique continue et étendue dispersant des petites inclusions d'alginate. Une telle structure était plus constante que celle observée pour le gel mixte 4-0,8/20 contenant des microdomaines d'alginate plus larges.

Malgré le fait que les mélanges 4-0,8/20 et 2-0,8/20 ne présentaient pas de textures similaires, leur valeur d'élasticité finale était proche. L'analyse des spectres mécaniques respectifs a permis d'identifier les éventuelles différences entre les gels au sujet de leurs propriétés rhéologiques ; prédominance d'un réseau d'alginate gouvernant les propriétés mécaniques pour les gels 2-0,8/10 ; 20 et.... De moins en moins marquée en augmentant la concentration en protéines dans les cas 4-0,8/10 ; 20, voire 6-0,8/10 ; 20.

6. Bilan des travaux de gélification



The Holy Graal ?!

6. Bilan des travaux de gélification

Les **parties 4.3** et **5.2.2** relaient les expérimentations relatives à la gélification *in situ* de globulines de pois pré-agrégées en mélange (incompatible) avec de l'alginate de sodium, à 20°C, en présence de GDL (1%, m/m) et de deux quantités de CC. La méthodologie a été décrite dans la **partie 4.3**. La gélification reposait sur une réduction progressive des répulsions électrostatiques entre les biopolymères d'une part, et d'autre part sur la libération de calcium qui permettait des interactions attractives entre groupements (carboxylate) négativement chargés. Les principales interrogations reposaient sur les relations entre composition initiale en biopolymères, propriétés rhéologiques des gels mixtes obtenus et données de microstructure. Le rôle du calcium et la quantité à mettre à disposition des biopolymères était également à déterminer. Son rôle était crucial selon toute vraisemblance dans le blocage cinétique de la séparation de phase, décrit dans les **parties 5.2.2-4**.

6.1. La gélification de l'alginate

Alors que la gélification *in situ* de l'alginate a été décrite à maintes reprises, l'ajout de protéines au mélange a été très peu décrit (Neiser et al., 1999). Et encore la gélification des protéines en mélange était induite par chauffage du mélange.

Ici, l'alginate (Alg) seul gélifiait facilement en présence de calcium - en quantités suffisantes à 20 mM de CC - et donnait des gels viscoélastiques typiques de polyosides (**partie 5.2.2**, **sous-partie 3.2.1** et **parties 5.2.3**). Le problème de la viscosité pour des solutions plutôt concentrées en alginate, ainsi que la granulométrie du sel de CC se posaient pour une bonne dispersion (Neiser et al., 1999). Il semblait d'autre part difficile d'envisager le décalage entre l'acidification induisant la dissociation de CC, la diffusion du calcium jusqu'aux sites de liaison et effectivement l'incorporation des cations au niveau des zones de jonction (très probablement GG) permettant la complexation des chaînes et la formation au final d'un réseau (Funami et al., 2009). En revanche, les forces finales de gels d'alginate étaient répétables. Ceci signifiait qu'un temps long (≈ 6 h) permettait au réseau d'alginate de se stabiliser lorsque le pH du mélange approchait sa valeur à l'équilibre ($\approx 3,8$), et probablement de se réorganiser lorsque davantage de calcium se libérait à ce moment là. Les zones de jonction MG/GG seraient d'abord impliquées à des quantités faibles de calcium libérées, puis interviendraient les zones homopolymériques GG/GG lorsque davantage de calcium était disponible à des pH plus faibles. Il est à noter qu'un excès de calcium pourrait

6. Bilan des travaux de gélification

déstabiliser le gel, de part la nature plutôt polyalternée de l'alginate mise en évidence par RMN ^1H (Donati et al., 2005 ; Funami et al., 2009). Il n'a pas été observé un tel affaissement du gel avec le temps de gélification ou avec la quantité de 20 mM de CC. De tels gels d'alginate polyalterné sont généralement faibles mais se forment à des concentrations basses en calcium (Funami et al, 2009).

Dans la suite (**partie 4.3**), PPN (= LPP en version anglaise) a été ajouté à l'alginate. Même si les protéines étaient dix fois plus concentrées (mélange 8-0,8/20 par exemple), l'alginate présenterait une plus forte affinité pour le calcium. L'ajout de PPN résultait en des gels d'alginate plus forts, probablement dû à l'enrichissement de l'alginate par effets ségrégatifs. Les gels étaient particulièrement viscoélastiques, même davantage que les gels d'alginate seul, avec une diminution marquée du module visqueux dans le domaine des basses fréquences. Egaleme nt la valeur de $\tan \delta$ supérieure à 0,1 mesurée à 1 rad/s traduisait que les microdoma ines protéiques étaient plutôt coagulés que gélifiés, avec une faible connectivité des protéines inter- et intra microdoma ines. Les globulines natives de pois ne pouvaie nt gélifier.

6.2 Gélification à froid des mélanges ; rôles combinés de l'alginate et de la quantité de calcium disponible

6.2.1. Etat du système protéines pré-agrégées-alginate (hors ajout GDL/ CaCO_3)

Dans l'étude en **partie 5.2.2** et contrairement aux études cités ci-dessus, il n'y avait pas chauffage du mélange pour entraîner sa gélification, et le système à la base protéines pré-agrégées - alginate montrait à 20°C et immédiatement après cessation de l'étape de mélange une séparation de phase à l'échelle microscopique (**partie 5.1.2, sous-partie 4.3**). L'incompatibilité dans de tels mélanges contenant APP était plus prononcée que lorsque les protéines natives PPN avaient été utilisées aux mêmes concentrations (voir **partie 4.2**). Ceci peut être attribué à la plus grande fraction volumique d'agrégats par rapport aux protéines natives dont ils sont issus (Croguennoc et al., 2001 ; Li et al., 2008). Les mesures de viscosité

6. Bilan des travaux de gélification

intrinsèque sur PPN (= LPP) et APP pourraient refléter ce gain « d'occupation de l'espace » en solution (voir **partie 5.1, sous-partie 4.1**).

La formation rapide d'une phase protéique étendue organisée en réseau à partir de 0,8% d'alginate et quelque fut la concentration en APP a été observée. L'hypothèse d'effets de déplétion supplémentaires à une séparation de phase par incompatibilité (étant donné que les particules protéiques pré-agrégées seraient plutôt sphériques (agrégation amorphe prédominante, confirmée par les observations au MET) pouvait être émise au regard de l'aspect granuleux de la phase protéique et de sa structuration rapide en réseau (Syrbe et al., 1998). Une telle hypothèse avait été émise par Li et al. (2008) sur un système semblable au notre, où la phase de globulines de soja pré-agrégées s'organisait rapidement en microdomaines larges et interconnectés. Une dilution des mélanges montrait une rupture d'une telle structure en réseau. Cette phase protéique présentait de même un caractère faiblement gélifiant avec le temps, du fait d'une solidification possible des microdomaines protéiques attribuée à la formation de micro-gels. La formation rapide d'un tel réseau protéique réduirait la mobilité moléculaire au sein de ces mélanges. Ceci a été mis en évidence par une maturation et un déphasage fortement ralenti des deux phases immiscibles coexistantes dans la plupart des mélanges (**partie 5.1, sous-partie 4.3, Figure 5 et Table 2**). Il s'agissait donc de tirer profit d'un tel effet fortement épaississant plutôt que gélifiant, concernant particulièrement les mélanges concentrés APP-Alg 4-1.2 % (m/m) et APP-Alg 6-0.8 %.

6.2.2. Ajout de GDL/CC : gélification induite

6.2.2.1. Protéines seules : absence de gélification

Il a été observé que le procédé de gélification testé ne s'appliquait pas à des solutions de globulines pré-agrégées seules (**partie 5.2.2, sous-partie 3.2.2**). Une précipitation a été notée, du fait très probablement d'un écrantage trop rapide des charges de surface. En diminuant la quantité de GDL, un coagula à faible rétention d'eau se formait, synonyme d'une agrégation désordonnée et d'une structure très poreuse (Subirade et al., 2005 ; Pires Vilela et al., 2011).

6. Bilan des travaux de gélification

6.2.2.2. Mélanges globulines pré-agrégées-alginate

L'alginate a été ajouté à ces protéines pré-agrégées. Par son caractère hautement hydrophile et sa capacité à lier rapidement le calcium, il jouerait en somme un rôle « stabilisateur » pour les protéines en mélange ; l'alginate pourrait éviter aux agrégats des variations brutales d'environnement ionique lorsque le pH décroît et le calcium ionique est libéré. La formation d'un réseau d'alginate est très dépendante de la quantité de calcium libérée. Aussi une plus grande extension d'un réseau gélifié polyosidique au sein d'un système mixte gouvernerait les propriétés mécaniques de l'ensemble du mélange (**partie 6.2**) (Beaulieu et al., 1999 ; Donato et al., 2005). Dans les deux cas, de forts effets ségrégatifs induits par une augmentation de la concentration en pectinates faiblement méthylés et à un taux constant de calcium libre (10 et 3 mM selon les auteurs) résultait en une sur-agrégation protéique et en une prédominance du réseau polyosidique. En outre, le gel mixte présentait une force de gel moindre qu'un gel purement protéique). Les deux systèmes étudiés par ces auteurs étaient compatibles lorsque la protéine était native (mélange non chauffé). Les effets ségrégatifs et l'agrégation protéique étaient générés par la combinaison du traitement thermique et de la concentration en calcium du milieu ; cette agrégation était défavorable à la formation d'un réseau protéique dense et continu pour de forts effets ségrégatifs induits à hautes concentrations en polyoside ($\approx 0,8$ % (m/m)). Or, notre système protéines pré-agrégées-alginate était incompatible d'emblée, et l'agrégation protéique serait d'abord liée aux effets ségrégatifs initiés dès le départ, au moment même de l'introduction d'incube CC puis de la GDL et CC.

Dans un premier temps, la microstructure de la plupart des mélanges de base protéines pré-agrégées - alginate (**partie 5.1.2, sous-partie 4.3, Figure 3**) était singularisée par un réseau continu de particules protéiques flocculées. Du fait de la haute fraction volumique des globulines pré-agrégées, les microdomaines enrichis en alginate étaient rapidement dispersés dans les porosités du réseau formé. Dès lors, la disponibilité en calcium et la cinétique de séparation de phase vont affecter la gélification du mélange.

Lorsque (i) **les effets épaississants ne ralentissent pas suffisamment la séparation de phase, une microstructure plutôt bicontinue était observée et en conséquence un gel plus faible** (Tolstoguzov, 1995). Ce cas est rencontré lorsque la quantité de CC ajoutée au mélange est en défaut (10 mM) et ne permettait pas une prise en gel du mélange assez rapide. Il est à rappeler que l'alginate présenterait une moindre affinité au calcium lorsque ce dernier est en défaut par rapport aux ions sodium, ce qui pourrait diminuer sa vitesse d'incorporation

6. Bilan des travaux de gélification

par les chaînes d'alginate (Neiser et al., 1999). De plus, des effets ségrégatifs moins prononcés à des compositions initiales en biopolymères ne favorisaient pas l'agrégation protéique dans des microdomaines d'apparence plutôt diffuse. Cela correspondait à des mélanges proches du domaine co-soluble défini par le diagramme de phase protéines pré-agrégées - alginate (**partie 5.2.1, sous-partie 4.2, Figure 2**). De même, et malgré des effets ségrégatifs plus prononcés en augmentant la concentration en alginate, un défaut de calcium à 10 mM de CC n'occasionnerait pas une agrégation protéique suffisante pour renforcer les interactions attractives inter-agrégats au sein de la phase protéique enrichie. Il a été suggéré dans ce cas de moindres enchevêtrements entre les deux phases coexistantes enrichies chacune en un des deux biopolymères et donc une diminution des interconnexions (ou interdépendances) via le calcium entre les réseaux qui ont pu se former.

Lorsque (ii) la séparation de phase était d'emblée très lente dans le cas de mélanges concentrés et en présence d'une quantité suffisante de calcium (20 mM), une microstructure enchevêtrée persistait. La stabilisation d'une telle microstructure semblait moins dépendante de la quantité de calcium disponible dans le milieu dans un premier temps. La phase protéique continue organisée rapidement en réseau figeait momentanément le mélange instable (**sous-partie 5.1.2.2, 4.3, Figure 4 et Table 2 ; 4.4, Figure 5**). Dans un deuxième temps, lorsque suffisamment de calcium ionique était libéré, la gélification s'opérait effectivement et donnait lieu finalement aux gels viscoélastiques les plus forts que nous ayons pu obtenir (APP-Alg 4-1,2/20 et 6-0,8/20). Le décalage entre la détection de la transition sol-gel (le point gel G_p) et la consolidation de la structure – par le développement marqué d'un comportement plutôt élastique, véritable signe de la gélification (De Jong et al., 2009) - pourrait provenir du réseau d'APP formé rapidement par de forts effets ségrégatifs, alors que la véritable prise en gel était amorcée lorsque le calcium libéré était suffisante; ce pH était de l'ordre de 5,4-5,7 pour les deux quantités de CC introduites initialement (**partie 5.2.2, sous-partie 3.2.3, Figure 5 et Table 2b**). **D'une manière générale, une séparation de phase plus rapide que la gélification tenderait à affaiblir la structure du gel mixte formé.**

Effectivement un réseau protéique continu formé par l'agrégation homogène des protéines et dispersant des microdomaines d'alginate, petits mais nombreux, semblait être la microstructure où l'effet de synergie entre les deux biopolymères incompatibles était le plus marqué. Des gels mixtes viscoélastiques ont été obtenus, avec en revanche un gain d'élasticité par rapport aux solutions d'alginate seul gélifiées (**Figure 5.1**). Le développement d'un réseau protéique ne serait permis que par de forts effets ségrégatifs. Le calcium libéré allait alors

6. Bilan des travaux de gélification

jouer un rôle de consolidation mutuel des deux réseaux. L'analyse au MET (partie 5.2.2, sous-partie 3.4, Figures 9-10) mettait en évidence que **les protéines pré-agrégées et l'alginate occupaient bien des phases séparées au sein des gels mixtes 4-0,4/20 et 4-1,2/20. Un manque de cohésion entre agglomérats (ou masses désordonnées) protéiques pour la formation d'un réseau protéique étendu - du fait de leur gélification rapide suggérée par de forts effets ségrégatifs – ne pouvait être pallié que par la présence de chaînes d'alginate qui entouraient ces mêmes agglomérats et pouvaient s'y greffer localement, voire même former localement des ponts entre agrégats.** Globalement, les gels mixtes étaient formés de deux biopolymères incompatibles, mais présentaient localement des interactions attractives et cela ne pouvait se produire que par l'intermédiaire du calcium ionique en quantités suffisantes, jouant le rôle de lien (ou « colle ») entre les deux réseaux formés. Du rapport de concentrations initiales entre les deux biopolymères devrait dépendre également le recouvrement des agglomérats protéiques par les chaînes d'alginate, également la distance entre agglomérats. Cet effet de synergie dû au calcium devrait à l'avenir être confirmé par un marquage du calcium afin de le localiser dans les mélanges (des indicateurs fluorescents du calcium peuvent être utilisés en MCBL, type calcium Green 2). Concernant la morphologie des agrégats avant gélification, une étude complémentaire par MET sur une solution diluée d'agrégats serait nécessaire. D'après Maltais et al. (2008), les agrégats thermiques de globulines de soja formés à pH >7 et sans sels ajoutés seraient comme des « briques » élémentaires qui s'associeraient plutôt en structures fibrillaires ou amorphes pour des apports respectivement faibles (10 mM) et élevés (20 mM) en calcium ionique.

Dans un deuxième temps, **le gain suggéré de cohésion entre les deux réseaux par ces interactions locales protéines agglomérées - Ca²⁺ - alginate, voire à un niveau supérieur agglomérat protéique - Ca²⁺ - alginate - Ca²⁺ - agglomérat protéique, serait d'autant plus prononcé que le nombre de points de contacts et d'enchevêtrements via le calcium entre les deux réseaux augmenterait.** Cela pourrait se produire si davantage de formes proto-fibrillaires des globulines de pois pré-agrégées étaient exposées à la surface des agglomérats. Ainsi il y aurait là matière à étudier plus en détail les conditions de dénaturation thermique des globulines de pois, en mélange ou fractionnées et d'en déterminer leur masse moléculaire, et surtout leur morphologie, leur taille.

Conclusion et perspectives

Cette présente étude se proposait d'étudier un système ternaire aqueux non décrit précédemment, constitué de globulines de pois et d'alginate. L'objectif était la construction d'une matrice gélifiée protéine-polysaccharide dans laquelle les deux biopolymères étaient incompatibles initialement. Ce premier choix stratégique reposait sur la possibilité de figer dans un état thermodynamiquement instable une large gamme de microstructures, permettant une plus grande flexibilité des propriétés de texture des biomatériaux formés. Cette même incompatibilité génèrerait en outre des effets de synergie entre biopolymères non-similaires, résultant en un gain de rigidité marqué par rapport aux mêmes biopolymères pris séparément. Il s'agissait donc de tirer profit à l'état semi-solide (gel) de ce facteur d'instabilité à l'état liquide. Un niveau supérieur de complexité est d'autant plus atteint lorsque les deux biopolymères sont capables de gélifier, donnant lieu à des gels mixtes où deux réseaux pourraient se développer indépendamment l'un de l'autre ou alors de manière plus enchevêtrée.

Partant d'une matière première assez peu documentée, le premier enjeu de l'étude était l'extraction de globulines de pois selon un procédé qui affectera le moins possible leur structure native. Les globulines de pois ont été ré-extraites à partir d'un isolat commercial délipidé présentant des propriétés thermiques et de solubilité jugées satisfaisantes. Ce travail de caractérisation était préalable à l'établissement de mélanges incompatibles à 20°C globulines à l'état natif-alginate, les paramètres du solvant étant fixés définitivement à pH 7,2 et 0,1 M NaCl durant toute la suite de l'étude. La description de l'état de phase a nécessité la mise en œuvre de différentes techniques récurrentes pour une caractérisation multi-échelles

- ➔ L'établissement de diagrammes de phase à une échelle de séparation macroscopique
- ➔ Des observations de microstructure selon la composition initiale du mélange et son évolution dans le temps, par microscopie confocale couplée à de l'analyse d'image.
- ➔ L'évaluation des propriétés rhéologiques des mélanges incompatibles, notamment leurs propriétés viscoélastiques.

Conclusion

Des effets ségrégatifs plus prononcés en augmentant globalement la composition initiale en biopolymères montraient le passage de microdomaines protéiques diffus à des microdomaines plus larges et plus denses qui coalesçaient et séparaient plus rapidement. De plus, le facteur polydispersion propre aux globulines végétales posait des problèmes évidents dans la résolution des limites de co-solubilité. Par fractionnement des globulines, un système fraction de légumine enrichie-alginate aux mêmes conditions de solvant que précédemment témoignait d'une séparation de phase plus nette, alors qu'un système viciline enrichie-alginate était macroscopiquement compatible. Ainsi la légumine gouvernerait la séparation de phase lorsque les globulines non fractionnées étaient employées. La variabilité structurelle et de composition des globulines de pois rend cependant difficile des comparaisons avec d'autres systèmes aqueux protéine-polysaccharide bien établis. Par ailleurs, le fractionnement des globulines de pois occasionnait des lourdeurs de procédures en combinaison avec des rendements faibles, ce qui nous a contraints d'utiliser dans la suite des globulines non fractionnées et de nous éloigner d'un système plus simplifié. De même, ceci rendait plus difficile la prise en compte de l'ensemble des interactions qui régissaient l'évolution du système. Mais en revanche on se rapprochait d'un système plus réel et peu coûteux – étant donné le choix de la source protéique.

Le deuxième enjeu était de développer une méthodologie de gélification *in situ* dans l'optique, à l'avenir, d'encapsuler au sein des matrices gélifiées des composés thermosensibles. Par rapport à la méthodologie de gélification thermique des protéines globulaires, seules ou en mélange, il a été envisagé dans cette étude une gélification en masse et à 20°C des mélanges par acidification et libération lentes de calcium au cours du temps. Bien documenté pour la gélification homogène de solutions d'alginate, ce procédé fait intervenir la GDL comme acidifiant et du carbonate de calcium. Notre singularité était d'adjoindre les globulines de pois avant d'opérer la gélification. Lorsque les globulines natives étaient utilisées, les mélanges donnaient des gels viscoélastiques remplis (alginate seul gélifiant dans ces conditions), dominés par un réseau d'alginate de force de gel (élasticité) supérieure à de l'alginate seul. La microscopie montrait une séparation de phase à l'origine d'un effet de synergie, mais l'absence de structuration de la phase protéique ne pouvait donner lieu à un co-gel.

Partant de ce constat, la même démarche a été entreprise avec cette fois des globulines pré-dénaturées et pré-agrégées thermiquement, afin qu'elles puissent éventuellement exprimer un pouvoir gélifiant. Une possibilité serait de faire varier la taille des agrégats protéique et

Conclusion

ainsi de véritablement estimer son effet sur l'état de phase et son évolution dans le temps de mélanges par ajout d'un polyside. La solution de globulines de pois pré-dénaturées avait été élaborée à concentration élevée (8% m/m) afin de balayer un domaine large de concentrations lors de la formulation de mélanges avec l'alginate. Par rapport aux mélanges incompatibles en présence d'alginate avec les protéines natives, la plus haute fraction volumique de la phase protéique donnait lieu, à partir de compositions plus basses en biopolymères, des microstructures bi-continues à continues pour la phase protéique. De tels mélanges pouvaient présenter une séparation de phase ralentie à bloquée temporairement par une gélification faible du réseau protéique. A ce sujet, il serait intéressant de prolonger les études de cinétique de séparation de phase par une méthode complémentaire, telle la spectroscopie par diffusion dynamique de la lumière adaptée à des systèmes turbides (DWS : diffusing wave spectroscopy) (Klein & Nägele, 1996).

Alors que les protéines seules ne pouvaient gélifier selon le procédé *in situ*, les mélanges protéines pré-agrégées-alginate formaient à froid des gels mixtes où la contribution d'un réseau protéique semblait évidente dans le gain de rigidité par rapport à l'alginate seul. Il apparaît que la présence d'alginate augmenterait la solubilité des agrégats protéiques, probablement d'une part en abaissant le pH d'électroneutralité du mélange, et d'autre part en complexant majoritairement le calcium ; la sur-agrégation protéique a été suggérée lorsque l'apport en calcium est trop élevé. En outre, **le blocage rapide de la séparation de phase serait dû à l'extension d'un réseau continu de particules protéique dispersant des microdomaines enrichis en alginate, qui ne pouvaient alors plus former un réseau étendu. Cela donnait lieu aux gels les plus élastiques.** Dans le cas où la séparation de phase pouvait s'opérer plus longuement, l'effet de synergie au regard de l'élasticité finale du gel était moins prononcé. De forts effets ségrégatifs en combinaison avec un apport optimal de calcium favorisaient davantage une agrégation protéique homogène et une structuration figée du mélange plus régulière. Il y avait là matière à s'interroger sur le fait que de telles structures enchevêtrées semblaient, d'après les corrélations microstructure-rhéologie permises par l'analyse d'image selon la méthode de cooccurrence, générer les gels les plus synergiques. **En dépit d'une séparation de phase claire à une échelle macromoléculaire,** une analyse par microscopie électronique a révélé que des interactions attractives locales inter-biopolymères aux interfaces des deux phases pouvaient s'établir par le rôle pontant du calcium non spécifique, et non pas par l'effet acidifiant de la GDL qui aurait pu occasionner des interactions locales entre les agglomérats protéiques et les chaînes

Conclusion

d'alginate. Le calcium jouerait un rôle clé dans la cohésion des deux réseaux, et la confirmation d'une telle implication ne pourrait se faire que par un marquage du calcium pour le localiser précisément. Toutefois, des gels viscoélastiques ont été obtenus le plus souvent, et davantage de rigidité ne pourrait se gagner qu'en augmentant le nombre et/ou en favorisant certaines interactions entre biopolymères.

Premièrement, il y a là matière à déterminer plus précisément comment moduler le ratio protéine/polyoside selon la fourniture en calcium, afin de favoriser plutôt une agrégation protéique linéaire permettant probablement un grand nombre d'enchevêtrements avec les chaînes d'alginate, plutôt qu'une agrégation amorphe plus aléatoire, où les chaînes d'alginate se grefferaient de manière plutôt clairsemée sur l'agglomérat massif.

Deuxièmement, l'alginate ne peut gélifier qu'en présence de calcium, une amélioration consisterait à modifier la granulométrie du sel de carbonate de calcium pour assurer sa dispersion fine et optimale dans l'ensemble du mélange. Troisièmement, la plupart des investigations à l'avenir – s'il y en avait – devraient se concentrer sur l'élaboration de la solution de globulines pré-agrégées. Il s'agit bien là d'un enjeu primordial, car le comportement à l'agrégation et plus généralement à la gélification est, selon les auteurs, très variable ; la non-standardisation des paramètres thermiques et encore la variabilité des globulines de pois constitueraient des obstacles persistants à leur utilisation généralisée, voire à la substitution de protéines animales, en termes d'agent texturation des aliments. Optimiser le traitement thermique, favoriser une forme d'agrégation protéique fibrillaire plutôt qu'amorphe, essayer de vraiment cerner si le contenu en légumine et les échanges de ponts disulfures pouvaient contribuer davantage au facteur rigidité du gel... Ajoutons également les problèmes de goût, d'odeur d'un point de vue organoleptique et de facteurs antinutritionnels.

Par rapport aux gels thermiques formés à haute concentration en protéines (10-16%), nous avons élaboré à froid des gels mixtes qui permettraient de réduire les concentrations en biopolymères à utiliser et en conséquence les coûts de matières premières. Il a bien été obtenu un gel à 2% (m/m) de globulines avec 0,8 % d'alginate et donnant un gel autoporteur... et rappelons que nous utilisons des protéines qui ne pouvaient pas gélifier seules selon notre procédé, mais en mélange avec l'alginate ; ne serait-ce pas là un premier effet de synergie ?

Dans cette présente étude, la caractérisation des gels mixtes reposait sur les données de viscoélasticité et de microstructure au cours de la gélification et sur les gels finis. Quoiqu'il en soit, les propriétés macroscopiques de texture (fermeté...) des gels mixtes finis devraient être

Conclusion

évaluées dans la suite. Par rapport aux mesures de rhéologie dynamique effectuées dans le domaine linéaire, des tests non linéaires provoquent des changements structurels irréversibles. Ceux-ci peuvent renseigner sur la taille des inhomogénéités (porosités...), mais aussi sur le type d'interactions qui génère le réseau de biopolymères (Beaulieu et al., 1999 ; Pires Vilela et al., 2011). De ce fait, les tests aux petites et grandes déformations sont complémentaires, afin de cibler des textures d'intérêt selon l'application envisagée.

A la base, le procédé *in situ* avait été retenue afin d'effectuer un suivi de la gélification (évolution dans le temps/du pH des modules G' et G''), voire de la moduler. Par la suite, il serait intéressant non seulement de comparer les propriétés rhéologiques aux grandes déformations pour des gels de même formule initiale en biopolymères et obtenus selon différents procédés, mais aussi de confronter leur microstructure. Envisager une gélification par dripping serait une possibilité, puisqu'il s'agit d'un procédé courant pour l'encapsulation d'entités thermosensibles. D'autres méthodes par émulsification/gélification ionique peuvent être citées, notamment pour l'encapsulation de matériaux vivants type probiotiques, avec des taux de survie avoisinant les 80-95% (Burgain et al., 2011). De nombreuses études recourent à l'alginate seul (ou autres dans une moindre mesure), cependant il n'a pas été reporté de gélification de systèmes mixtes incompatibles par de tels procédés, d'où un champ d'investigations nouvelles.

Encapsuler du vivant est un défi des plus complexes, lorsqu'il s'agit de concilier survie cellulaire au cours de la gélification et conservation à l'état sec dans le temps. Des travaux préliminaires ont été initiés de notre côté. Une collaboration basée sur la mutualisation des compétences entre formulation et procédés microbiologiques de séchage de matériaux vivants a été engagée ces derniers mois. En effet, le concept de départ du gel à froid reposait sur son potentiel pouvoir encapsulant d'agents actifs thermosensibles.

Comparant un gel d'alginate seul et de protéines de pois pré-agrégées-alginate, l'objectif primordial était d'évaluer la survie d'une souche cellulaire probiotique au cours de la gélification *in situ*. Dans la suite, un séchage lent et doux développé par nos collègues microbiologistes a été opéré. Des premiers résultats semblent indiquer que le gel mixte séché présentait des taux de survie supérieurs à 90%, ce qui est assez prometteur. Des observations au MCBL de localisation de ces mêmes probiotiques par double marquage (des protéines et des cellules encapsulées) sur le gel mixte devraient être entreprises. Le recours à des gels biphasiques pose bien sûr la question de la localisation préférentielle de l'agent introduit avant

Conclusion

gélification, selon son affinité pour la phase protéique ou polysidique. D'autres expérimentations concerneraient l'effet de l'ajout de composés actifs (ainsi que leur concentration) sur les propriétés rhéologiques des gels mixtes. En outre, la présence de deux phases gélifiées opposerait un rôle de barrières différentielles, lorsque les capsules séchées seraient soumises à des tests de dissolution. La protection de l'agent actif envers des modifications environnementales est un premier enjeu. Quant à la libération dans des conditions environnementales spécifiques (pH...), celle-ci pose la question de la dégradation de la matrice d'encapsulation et/ou la diffusion des agents actifs au cours du temps. Concernant les probiotiques, le gel d'encapsulation doit prémunir du pH acide (≈ 2) de l'estomac, et permettre une libération dans la suite du tractus à des pH plutôt basiques et en présence d'enzymes digestives. Dans le cas où des phytobiotiques cette fois viendraient à être encapsulés, la libération lente dans les sols dépendrait directement de la biodégradabilité de la capsule dans le temps.

Bien que de tels gels « à retardement » offrent la possibilité de les mouler et ainsi de leur conférer des formes variées (films, cylindres...), la méthodologie de gélification *in situ* appliquée dans cette étude est difficilement viable industriellement (production en batch, temps longs d'incubation). En revanche, il pourrait être développé de nouveaux produits alimentaires, comme par exemple en substituant la GDL par des bactéries type lactobacilles (en réalité la GDL mime l'effet acidifiant de bactéries qui convertissent le lactose en acide lactique) utilisées dans l'industrie laitière. Cela ouvrirait un champ important d'études où les protéines végétales, telles les protéines de pois, viendraient se substituer totalement ou partiellement aux protéines laitières dans ce type de produits fermentés.

D'ici là...

Partie « publications »

Publication 1 (P1)

Food Hydrocolloids 28 (2012) 333–348



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd



Protein aggregation induced by phase separation in a pea proteins–sodium alginate–water ternary system

J.-L. Mession^a, A. Assifaoui^{a,b}, C. Lafarge^a, R. Saurel^{a,*}, P. Cayot^a

^a *Agrosup, Department EMMA (Eau-Molécules Actives-Macromolécules-Activités), 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France*

^b *School of Pharmacy, Université de Bourgogne, 7 bd Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 July 2011
Accepted 21 December 2011

Keywords:
Pea globulins
Sodium alginate
Phase separation
Aggregation
Confocal laser scanning microscopy
Rheological properties

ABSTRACT

The physicochemical properties of a native, globular plant protein–linear anionic polysaccharide aqueous system at 20 °C were investigated in conditions where biopolymers carry a net negative charge (pH 7.2, 0.1 M NaCl). The pea proteins–sodium alginate mixtures showed a phase separation mainly by thermodynamic incompatibility, characterized at both the macroscopic and microscopic scale. Phase diagram was established and confocal laser scanning microscopy (CLSM) provided accurate data on the microstructure morphology of the system, regarding its phase behavior. In admixture, sodium alginate induced a protein aggregation, certainly by a local depletion of the polysaccharide. Protein aggregates were present in both single-phase and biphasic mixtures, while increasing the sodium alginate concentration provided larger and denser protein microdomains, leading to a non-equilibrium state. By phase separation, the pea protein aggregates entrapped a part of the sodium alginate phase, thus modifying the protein volume fraction. Along a tie-line, a phase inversion phenomenon was detected, from a sodium alginate to a pea proteins–continuous phase. Rheological properties of the mixed systems depended on the biopolymer composition and were modified with respect to individual components. The protein-enriched phase volume fraction modified the flow behavior to non-Newtonian for starting concentrated mixtures; a shear-thinning at high shear rates was evidenced, while mixtures with a particularly high sodium alginate concentration (>0.8 wt%) had an apparent yield stress for low shear rates. Mechanical spectra showed that both protein enrichment within microdomains in the presence of alginate and stronger protein–protein interaction with time impacted the viscoelastic properties (G' and G'' moduli) of the whole mixture.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Due to their wide use in both food and pharmaceutical industries, aqueous mixtures of proteins and polysaccharides have been extensively studied for years (Grinberg & Tolstoguzov, 1997; Syrbe et al., 1995; Tolstoguzov, 1986, 1991). However difficulties arise from the heterogeneity and the non-standard nature of the biopolymers. Interactions between proteins and polysaccharides in aqueous systems influence the phase behavior of such ternary blended systems, impacting their structural and textural properties and hence their stability. Two cases can be distinguished: miscibility and phase separation. Miscibility is due to co-solubility between molecules, where biopolymers are diluted and/or with a low molecular weight, so they do not interact to each other. Phase

separation is a more general phenomenon, where biopolymers mixtures are thermodynamically unstable and separate into two phases. Phase separation can be “associative” or “segregative”. Interactions between biopolymers are specifically (ionic) and non-specifically (hydrogen, hydrophobic bonding, Van der Waals forces,...) attractive for the associative phase separation and non-specifically repulsive (electrostatic and/or from a volume excluded effect) for the segregative phase separation (Dickinson & Mc Clements, 1995; Doublier, Garnier, Renard, & Sanchez, 2000).

In protein–anionic polysaccharide aqueous mixtures, intermolecular complexes are formed when proteins and anionic polysaccharides carry opposite surface charges; especially when the pH is lower than the isoelectric pH of the proteins. Protein–polysaccharide complexes are concentrated in the lower phase and can be insoluble when surface charges are neutralized, while the upper phase is depleted with macromolecules (Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon, & Hardy, 1998). Complex formation between protein and polysaccharide is inhibited when the pH is

* Corresponding author. Tel.: +33 380 774 051; fax: +33 380 396 647.
E-mail address: rsaurel@agrosup.dijon.fr (R. Saurel).

Publication 2 (P2)

Food Hydrocolloids 29 (2012) 335–346



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd



Effect of pea proteins extraction and vicilin/legumin fractionation on the phase behavior in admixture with alginate

J.-L. Mession^a, A. Assifaoui^{a,b}, P. Cayot^a, R. Saurel^{a,*}

^aAgroSup Dijon, UMR PHM 02.102, Equipe HPC (Produits Alimentaires et Physico-Chimie), 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

^bSchool of Pharmacy, Université de Bourgogne, 7 bd Jeanne d'Arc, 21075 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 May 2011
Accepted 12 March 2012

Keywords:
Pea globulins
Legumin
Vicilin
Heterogeneity
Sodium alginate
Segregative phase separation
CLSM
Microstructure

ABSTRACT

Soluble and natural mixed pea proteins (PP) were extracted from defatted pea seeds according to acidic precipitation (PPP) or ultrafiltration/diafiltration (PPDF) procedures. The isolates contained proteins with a low level of denaturation. Mixed pea globulins isolates presented quite similar solubility and thermal profiles, also a similar polypeptide composition. Vicilin/conviclin 7S (Vic) and legumin 11S (Leg) fractions were obtained by batch chromatography using a salt gradient for the elution. Several incompatible systems were built by mixing the pea proteins with an anionic polysaccharide (sodium alginate, SA), when biopolymers were both negatively charged. Most of mixtures exhibited a phase separation phenomenon. From phase diagrams, experimental binodal curves obtained with either mixed globulins or legumin fraction were apparently very close. However phase boundary was better-defined with the Leg fraction. No macroscopic phase separation was evidenced for mixtures with the vicilin fraction. Microstructure of the PP-SA mixtures was investigated by confocal microscopy (CLSM) according to PP composition and biopolymer initial composition. The Leg-SA and most of PPP-SA mixtures exhibited a droplet-like structure, while structure of PPDF-SA mixtures was aggregated-like. With mixed PP, an alginate entrapment within the PP-enriched phase would disturb phase separation. Also density and shape of the protein-enriched microdomains influenced kinetics of demixing. Polydispersity within the PP-SA mixtures, in terms of wide range molecular weights distribution and charge heterogeneity would explain such differences.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Proteins and polysaccharides are two major compounds encountered in almost all food systems. When mixed together in solution, interaction between those biopolymers governed the phase behavior of such blended systems, hence impacting their structural, textural properties and hence their stability. Biopolymers in admixture can be miscible or immiscible (unless limitedly co-soluble). Single-phase mixtures refer commonly to diluted biopolymers solutions and/or biopolymers with a low molecular weight so that they do not interact to each other. Increasing biopolymer initial concentrations led to unstable mixtures. Depending on the type of interaction, such phase separation phenomenon could be "associative" or "segregative" (De Kruif and Tuinier, 2001; Grinberg & Tolstoguzov, 1997; Syrbe, Fernandes, Dannenberg, Bauer, & Klostermeyer, 1995; Tolstoguzov, 1986, 1991). Associative phase separation occurs when protein and

anionic polysaccharide are oppositely charged (below the protein's isoelectric pH). Soluble or insoluble interbiopolymer electrostatic complexes are then formed, and concentrated in a lower phase while the upper phase is depleted with biopolymers (Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon, & Hardy, 1998; Tolstoguzov, 1991).

For a mixture containing polymers (1, 2) with a random coil conformation, segregative phase separation is usually described by the Flory–Huggins theory; indeed, phase behavior of a mixture is a consequence of the balance between polymer1-polymer2 and polymer1(2)-solvent interactions (Grinberg et al., 1997). The appearance of an excluded volume for each polymer led to an enhancement of polymer–solvent interaction. Then mixture split into two liquid phases at the equilibrium, as a result of polymer segregation in separated phases. By thermodynamic incompatibility, it is more favorable that each polymer is surrounded by like polymers than unlike polymers remain mixed together (Tolstoguzov, 1986, 1991). Nevertheless, the Flory theory could not be applied reliably for mixtures of dissimilar polymers, in terms of shape and structure; this is the case for globular proteins or colloidal protein particles mixed with polysaccharides of elongated shape (De Kruif & Tuinier, 2001).

* Corresponding author. Tel.: +33 380 774 051; fax: +33 380 396 647.
E-mail address: rsaurel@agrosup.dijon.fr (R. Saurel).

(Si le principe de certaines méthodes semblait obscur au premier abord...)

Annexes

Annexe 1 : acides aminés

Table A.1

Comparaison de la composition moyenne en acides aminés pour des globulines de pois (Légumine 11S/viciline 7S) et de soja (glycine 11S/conglycine 7S. (d'après Derbyshire et al., 1976 ; Emmert et al., 1995 ; Jackson et al., 1969 ; Savage & Deo, 1989 ; O'Kane et al. 2005 ; Rangel et al., 2003 ; Riblett, Herald, Schmidt & Tilley, 2001)

Globuline Acide aminé	Légumine 11S (1; 2; 3) ^b	Viciline 7S (1; 2; 4)	Glycine 11S (4; 5)	Conglycine 7S (5; 6)
Asparagine (+ ac. aspartique)	12.1±0,6 ^a	12±0	9±4,46	8.8±1.5
Thréonine	3.4±0,1	3.4±0,6	1.3 (6)	1.3 (6)
Sérine	5.9±1	6.2±0,7	5.8±1,7	7.9±0,1
Glutamine (+ ac. glutamique)	19.6±2,1	18.5±1,3	16.2±5	22.1±2,3
Proline	5±0,6	4±0,9	7.6±1,4	7.3±0,23
Glycine	6.2±2	3.7±1,1	5.3±1,4	5.8±0,4
Alanine	5.5±1,2	3.7±1,2	5.7±0,3	5.5±0,1
Valine	4.7±0,3	5.1±0,8	4.3±0,9	3.4±0,2
Cystéine	0.7±0,1	0.25±0,21	1.8±0,5	1.1±0,1
Méthionine	0.6±0,1	0.5±0,5	1.1±0	0.9±0,5
Isoleucine	4.8±2,24	5.1±0,1	4.3±0,9	3.8±0,1
Leucine	7.8±0,29	9.1±0,1	11.7±5,5	5.3±6
Tyrosine	2.5±0,7	2.7±0,6	3.1±0,4	3.1±0,4
Phénylalanine	4.1±0,7	6.1±0,1	7.7±3,2	6.2±0,7
Lysine	4.8±0,35	7.3±1,1	6.6±2,9	7.7±1
Histidine	2.6±0,2	2.4±0,5	1.7±0,4	1.9±0,4
Arginine	1.25±1,2	6.9±0,8	6.1±1,4 (6)	9.1±0,5 (6)
Tryptophane	0.8±0,4	0.1±0	0,7	0.1±0

^a Les valeurs présentées sont les moyennes ± écart-types, calculés à partir de données de la littérature. ^b Les références qui ont servi aux calculs sont indiquées par des chiffres : (1) : Derbyshire & al., 1979 ; (2) Savage et al., 1989 ; (3) : Jackson et al., 1969 ; (4) O'Kane et al., 2004d ; (5) : Ryblett et al., 2001 ; (6) : Emmert et al., 1995. ^c les auteurs de la référence (5) n'avaient pas pu obtenir la composition en acides aminés arginine et thréonine des globulines de soja. La référence (6) fournissait des valeurs, mais pour des globulines de soja **non-séparées**. ^d Les acides aminés qui figurent en **gras** sont hydrophobes.

Annexe 2 : Analyse enthalpique différentielle (AED)

Cette méthode permet d'évaluer les paramètres thermodynamiques au cours de la transition de phase de systèmes solides ou liquides (Speyer, 1994). Elle repose sur le chauffage (et/ou le refroidissement) progressif (cinétique modulable) en parallèle de deux capsules dont l'une contient l'échantillon et l'autre sert de référence (soit elle est vide, soit elle contient le solvant seul). La différence de puissance électrique convertie en flux de chaleur dQ est mesurée en tout instant pour toujours maintenir les deux capsules à la même température T (**Figure A.1**). Si une transition s'opère dans un intervalle de températures T_1 et T_2 , on aura alors d'après l'**Equation (A.1)** :

$$dQ = dH + C_p dT, \quad (\text{Eq. A.1})$$

avec $T_1 < T < T_2$

avec dH , l'enthalpie de la transition et C_p la différence de capacité calorifique entre l'échantillon et la référence. Par intégration, on obtiendrait la valeur d'enthalpie de la transition ΔH (**Equation (A.2)**) :

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} dQ - C_p \int_{T_1}^{T_2} dT \quad (\text{Eq. A.2})$$

Ainsi une transition de phase qui nécessite un apport supplémentaire d'énergie par rapport à la référence sera endothermique, à l'inverse un moindre apport traduira une transition exothermique. Concrètement, le thermogramme obtenu en fin de l'analyse renseigne sur l'occurrence de telles transitions par la présence d'un pic dont l'aire est proportionnelle à ΔH . A partir de T_1 débute la transition. A la température dite de transition T_d se produit la vitesse maximale de transition ; celle-ci correspond à la température au maximum du pic (**Figure A.1**). La température de dénaturation T_d est un indicateur de la stabilité thermique, précédée de la température T_{onset} où débute le déploiement de la structure compacte globulaire. L'enthalpie de dénaturation ΔH_d reflète l'évolution des structures organisées (hélice α , feuillet β ...) de la protéine lors du passage de l'état natif à dénaturé (Tang, 2008). Le flux d'énergie

A. Annexes

(chaleur) apporté par l'appareillage induit des remaniements profonds dans la structure native de la protéine, sans pour autant qu'il y ait rupture de sa séquence primaire (Tanford, Bunville & Nozaki, 1959).

Dans le cas de solutions de protéines globulaires, l'AED renseigne sur ses paramètres thermiques et par voie de conséquence son degré de dénaturation. Une protéine préservée dans un état natif montrera un pic endothermique significatif au cours de son chauffage, si celui-ci vise une température suffisante ($>60^{\circ}\text{C}$ pour des globulines en règle générale) qui induira des changements conformationnels plus ou moins profonds, c'est-à-dire des dénaturations réversibles/irréversibles. La température T_1 correspond à l'initiation de la dénaturation et la température de transition au maximum du pic est la température dite de dénaturation T_d ; cette dernière traduit la stabilité thermique de la protéine considérée. La valeur de ΔH ramenée à la concentration en protéines en solution est une mesure de son niveau de structures organisées, et l'écart de température entre T_1 et T_d permet d'estimer la nature des forces coopératives lors du passage de l'état natif à dénaturé, en d'autres termes si les changements conformationnels s'effectuent plutôt progressivement ou à plusieurs niveaux de structures simultanément (Tang, 2008). Il est à noter que la valeur de ΔH est un bilan des réactions endothermiques et exothermiques au cours du chauffage, tout en gardant à l'esprit qu'une dénaturation de protéines globulaires est suivie d'une agrégation via les zones hydrophobes exposées, réaction qui est exothermique (Choi & Ma, 2005).

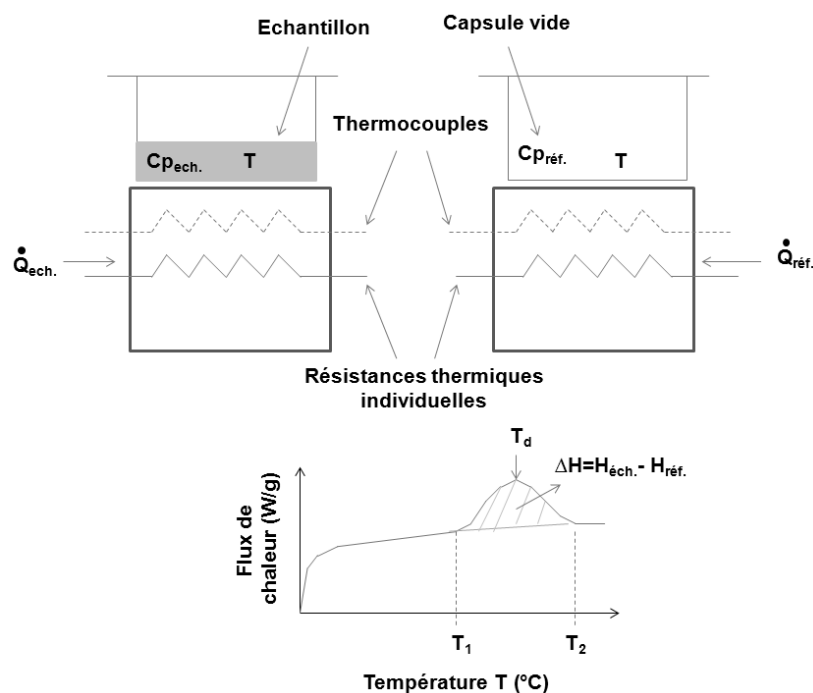


Figure A.1 : Principe de fonctionnement de l'AED (d'après Speyer, 1994).

A. Annexes

Annexe 3: rhéologie oscillatoire aux faibles déformations

Par rapport à la rhéologie aux grandes déformations qui caractérise un gel, la rhéologie oscillatoire est la méthode la plus sensible permettant d'évaluer la structuration au cours de la formation d'un matériau, pour ce qui nous concerne un mélange de biopolymères au cours de sa gélification. Ainsi la transition sol-gel (ou point gel) qui voit le passage d'un état fluide à un état (semi-)solide peut être mise en évidence (Grillet, Wyatt & Gloe, 2012). La méthodologie, non-destructive (par rapport à la rhéologie aux grandes déformations), consiste en une déformation (ou sollicitation) γ appliquée à la matière de manière sinusoïdale (**Equation. (A.3)**) (www.ppm.d.espci.fr/sites/www.ppm.d.../cours_rhodia_2006_rheo.ppt):

$$\gamma(t) = \gamma_0 e^{i\omega t} \quad (\text{Eq. A.3})$$

avec γ_0 et ω l'amplitude et la fréquence de l'oscillation, respectivement.

Dans le domaine de faibles amplitudes où le comportement viscoélastique est linéaire, le matériel répondra sous forme de contrainte σ (**Equation (A.4)**) :

$$\sigma(t) = \sigma_0 e^{i(\omega t + \delta)} \quad (\text{Eq. A.4})$$

avec σ_0 et δ l'amplitude de la contrainte et le déphasage par rapport à la contrainte, respectivement. Pour (i) un matériel purement élastique d'élasticité G , la contrainte est proportionnelle à la déformation, alors que pour (ii) un liquide visqueux de viscosité η , cette contrainte est proportionnelle à la vitesse de déformation $\dot{\gamma}$ (**Equation (A.5)**) (**Figure A.2**) :

$$(i) \quad \sigma = G\gamma$$

$$(ii) \quad \sigma = \eta \dot{\gamma}$$

$$\dot{\gamma}(t) = \gamma_0 \omega \cos(\omega t) \quad (\text{Eq. A.5})$$

A. Annexes

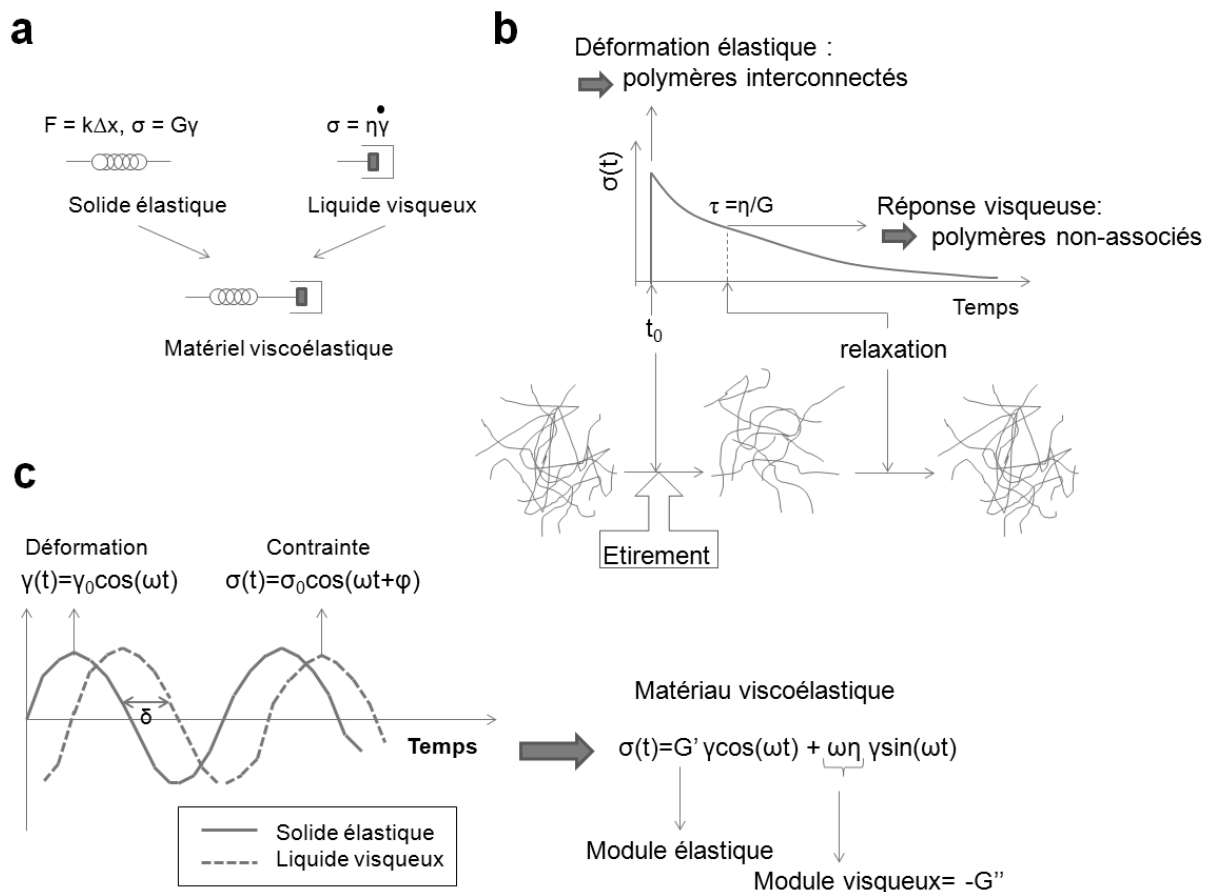


Figure A.2 : Principe de la rhéologie dynamique aux faibles déformations. (a) : définition d'un matériau viscoélastique d'après le modèle du ressort et du piston en série (ou modèle du liquide de Maxwell) ; (b) : notion de temps de relaxation pour des chaînes de polymères enchevêtrées et/ou libres ; (c) : en régime dynamique, réponse aux faibles déformations d'un matériau viscoélastique.

Ainsi des matériaux viscoélastiques comme des gels ont une réponse intermédiaire entre ces deux cas extrêmes. Dans le modèle de viscoélasticité de Maxwell, les déformations élastique et visqueuse s'additionnent pour des contraintes σ identiques (**Equation (A.6)**) :

$$\gamma = \frac{1}{G} \frac{d\sigma}{dt} + \frac{\sigma}{\eta} \tag{Eq. A.6}$$

Un temps de relaxation caractéristique $\tau = \eta/G$ est alors défini, qui permet de déterminer des déformations (ou relaxations) lentes (comportement de solide) à rapides (comportement de liquide). La contrainte et la déformation sont reliés par un module de cisailment complexe G^* tel que (**Equations (A.7)**) :

$$\sigma(\omega, t) = G^*(\omega)\gamma(t)$$

A. Annexes

$$G^* = G' + iG''$$

$$\tan \delta = \tan \left(\frac{n\pi}{2} \right) = \frac{G''}{G'}$$

$$G^* = \frac{\sigma^*}{\gamma^*} = \sqrt{(G')^2 + G''^2}$$

(Eq. A.7)

Un module dit de stockage (ou conservatif) G' et un module visqueux G'' sont alors définis, correspondant à l'énergie élastique accumulée au cours de la déformation (en phase avec la déformation) et à l'énergie dissipée ou perdue (en quadrature de phase), respectivement. Ainsi la réponse du matériau est plutôt (i) élastique à des temps τ très courts (instantanés), (ii) visqueuse à des temps τ longs. Ceci s'explique par le fait que (i) des polymères constitutifs du matériau sont interconnectés en réseau et opposent une force à la déformation (type étirement) appelée élasticité, par rapport à (ii) des polymères en solution visqueuse présentant des enchevêtrements physiques (absence d'interconnexions).

L'angle de phase δ reflète les contributions relatives de la composante visqueuse et de la composante élastique. Les valeurs prises par G' et G'' sont indépendantes de l'amplitude de la déformation dans le domaine linéaire de viscoélasticité et cela quelque soit la fréquence ω . Pour des déformations plus importantes, des modifications de structure du matériel telles que des ruptures de liaisons entraînent une diminution des deux modules (non-linéarité).

Dans le cas d'un suivi de gélification de polymère(s) en solution, G' et G'' sont mesurés dans le temps à fréquence constante et basse. Dans un état liquide (visqueux), G'' et G' sont faibles, avec G'' supérieur à G' . La faible contribution élastique est attribuée aux étirements et enchevêtrements des polymères. Au fur et à mesure que les chaînes s'associent, les deux modules augmentent. Des temps de relaxation plus courts témoignent d'une structuration du système, par une mobilité des polymères qui diminue de plus en plus, et ainsi une augmentation du nombre d'enchevêtrements, plus durables. Au point gel, les deux modules sont égaux ($G' = G''$; $\tan \delta = 1$, indépendant de la fréquence dans un large domaine). Un réseau macroscopique est alors formé, et le module élastique G' augmente fortement du fait de sa maturation. Les deux modules évoluent alors suivant une loi de puissance, indépendamment de la fréquence appliquée et dans un domaine large de fréquences.

Lorsque la gélification est achevée, G' et G'' atteignent leur valeur d'équilibre et se stabilisent. Pour un gel très rigide, la valeur de $\tan \delta$ sera très faible, la contribution visqueuse

A. Annexes

étant (pratiquement) négligeable. Le module élastique restera constant quelque soit la fréquence appliquée. Pour des gels (viscoélastiques) présentant des imperfections, les deux modules augmenteront avec la fréquence appliquée. Dans le domaine des basses fréquences, G' approche un plateau appelé module d'équilibre du réseau gélifié, qui traduit la prédominance des interactions au sein du gel par rapport aux enchevêtrements physiques de durée de vie inférieure à la période d'oscillation. A des fréquences plus hautes, les mouvements du solvant et des enchevêtrements plus persistants contribuent davantage à la réponse du matériel, et ainsi les deux modules augmentent (Grillet et al.,2012).

Annexe 4: Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Pour un microscope optique à transmission, l'échantillon est illuminé dans son ensemble par une source de lumière. L'observation est directe, considérant l'échantillon dans sa globalité. Le rendu de la structure observée souffre néanmoins d'une mise au point qui ne peut s'effectuer sur plusieurs plans superposés ; cette mise au point s'effectuant sur une fine couche d'échantillon, les plans supérieurs apparaissent floutés du fait de l'épaisseur de l'échantillon. A l'opposé, le principe du microscope confocal repose sur un faisceau lumineux d'excitation focalisé sur un plan de l'échantillon en particulier dit « confocal » (**Figure A.3**) (Paddock, 2000). Un diaphragme appelé « pinhole source » permet de concentrer ce faisceau, généré par un ou plusieurs lasers monochromatiques, en un point lumineux réfléchi via un miroir dichroïque et focalisé sur un plan confocal de l'échantillon, en passant à travers la lentille de l'objectif. Selon les marquages fluorescents de l'échantillon réalisés au préalable, la lumière réémise suite à l'excitation retransverse l'objectif et passe par le « pinhole du détecteur » de même ouverture que le premier (d'où le terme « confocal »). Celui-ci empêche que la lumière réémise au-dessus ou en dessous du plan confocal soit considérée par la suite, ce qui est la clé du MCBL. Tout faisceau franchissant le deuxième pinhole est pris en compte par le détecteur (« photomultiplicateur ») qui convertit le signal lumineux en signal électrique. L'image est reconstituée selon un plan X, Y en fonction du balayage effectué. Un balayage est également possible en Z lorsque la platine est motorisée. Ainsi les plans obtenus sont superposés tels que lors d'une tomographie, et permettent de reconstituer un volume en trois dimensions

A. Annexes

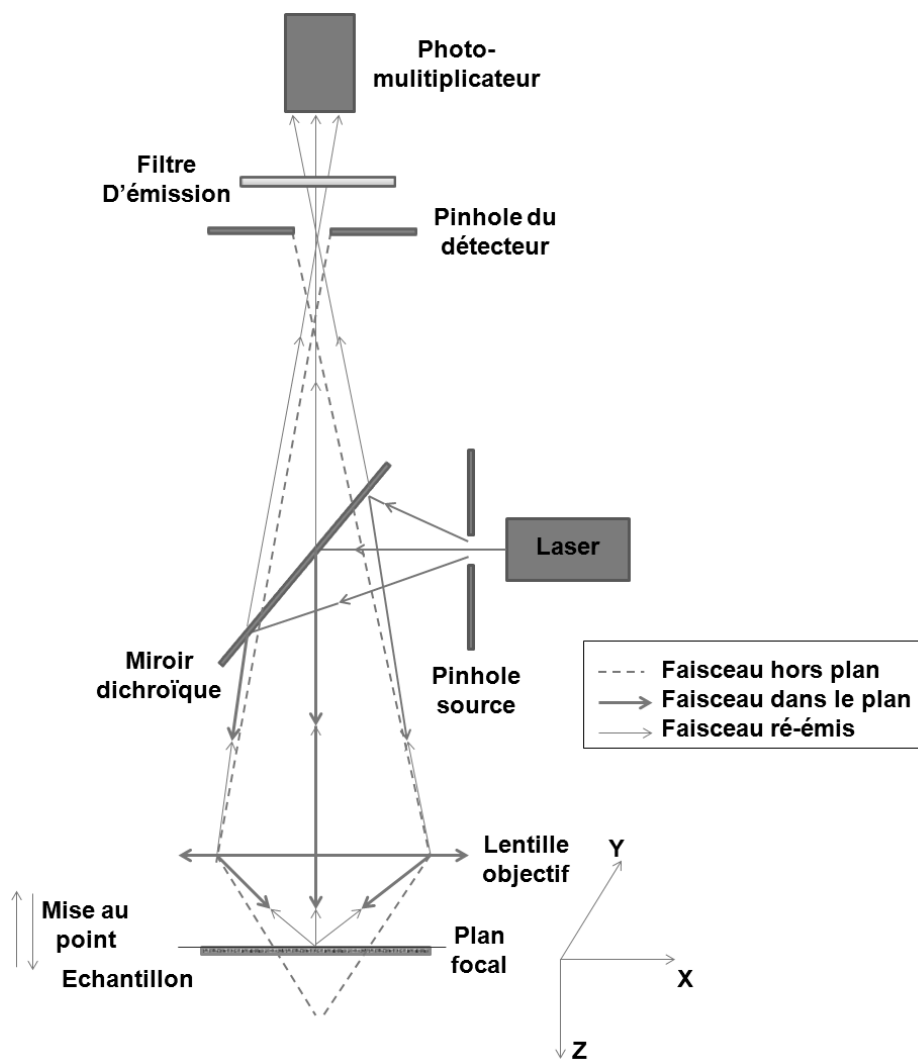


Figure A.3 : Principe de fonctionnement d'un MCBL (D'après Paddock, 2000)

Annexe 5 : Microscopie Electronique en Transmission (MET) – mode image

La technique MET a été inventée par Knoll et Ruska en 1931. Microscopie optique (ou photonique) utilisent toutes deux une source d'illumination qui émet un rayonnement (ou faisceau), focalisé sur l'échantillon par un système de condenseurs. Un système de lentilles reconstitue l'image finale agrandie, d'abord (i) la lentille de l'objectif qui focalise le faisceau qui a traversé l'échantillon suffisamment fin (d'où un fonctionnement en transmission) et les lentilles de projection qui agrandissent une zone de l'image intermédiaire obtenue précédemment. Enfin un système d'enregistrement permet l'acquisition de l'image.

La résolution d'un microscope est donnée par la distance minimale d entre deux points de l'échantillon observé que l'on peut distinguer séparément (**Equation (A.8)**). L'image d'un point est en effet un disque appelé tâche d'Airy :

$$d = \frac{0,61 \times \lambda}{n \times \sin \alpha} \quad (\text{Eq. A.8})$$

Augmenter la résolution revient à diminuer d , et cela peut s'opérer :

- (i) En réduisant la longueur d'onde λ
- (ii) En augmentant l'indice de réfraction n (≤ 1)
- (iii) En augmentant l'ouverture de l'objectif α

Ainsi, il semble que le paramètre sur lequel on peut le plus jouer est λ , d'autant plus que l'on ne peut construire des objectifs avec une très grande ouverture et que n dans le vide est égal à 1. Dans le domaine du visible, λ est cependant élevé (380-780 nm) et il s'imposerait donc de choisir un rayonnement de plus faible longueur d'onde.

Pour un rayonnement électromagnétique, le passage d'énergie de la lumière à la matière se produit de manière inversement proportionnelle à la longueur d'onde du photon (**Equation (A. 9)**) :

$$E = h \times \nu$$

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

A. Annexes

$$\lambda = h \times \frac{c}{E} \quad (\text{Eq. A.9})$$

avec E l'énergie du rayonnement électromagnétique (photon), h la constante de Planck ($6.624 \cdot 10^{-34}$ J/s), ν la fréquence, λ sa longueur d'onde associée et C la vitesse de la lumière dans le vide.

Depuis la théorie corpusculaire démontrée par de Broglie, un rayonnement est défini comme la dualité entre une onde et une particule en mouvement, suivant l'équation d'onde (**Equation (A.10)**).

$$\lambda = \frac{h}{m \times v} \quad (\text{Eq. A.10})$$

avec m la masse la particule et v la vitesse de la particule.

Considérons un électron de charge e ($1.6 \cdot 10^{-19}$ coulomb), de masse m ($9.11 \cdot 10^{-28}$ g). Lorsque celui-ci traverse une différence de potentiel V (volts ou J/coulomb), il acquiert une énergie cinétique sous la forme (**Equation (A.11)**) :

$$E = \frac{1}{2} mv^2$$

et donc $v = \sqrt{2eV/m}$ (**Eq. A.11**)

En réinjectant dans (**Eq A.10**), on obtient (**Equation. A.12**) :

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meV}} = \frac{h}{\sqrt{2mE}} \quad (\text{Eq. A.12})$$

Cependant, une correction relativiste de la masse m de l'électron doit être effectuée lorsque celui-ci approche la vitesse de la lumière, pour $E > 100$ keV. L'**Equation (A.13)** de Hall (1966) est alors plus adaptée que (**Eq. A.12**) :

$$\lambda \text{ (nm)} = \frac{1,23}{\sqrt{V(1 + 10^{-6}V)}} \quad (\text{Eq. A.13})$$

Dès lors, il est aisé de comprendre que λ peut être diminuée en augmentant la tension d'accélération des électrons. Par cette stratégie, la technique MET permet des grossissement inatteignables par microscopie photonique, de 500000 à 500000 de fois, voire plus de 1000000 de fois pour des MET à haute résolution. Comme l'air freine la trajectoire des électrons, un MET fonctionne **sous vide** ($n=1$, **Eq. A.8**).

A. Annexes

La **Figure A.4** donne les éléments d'un MET :

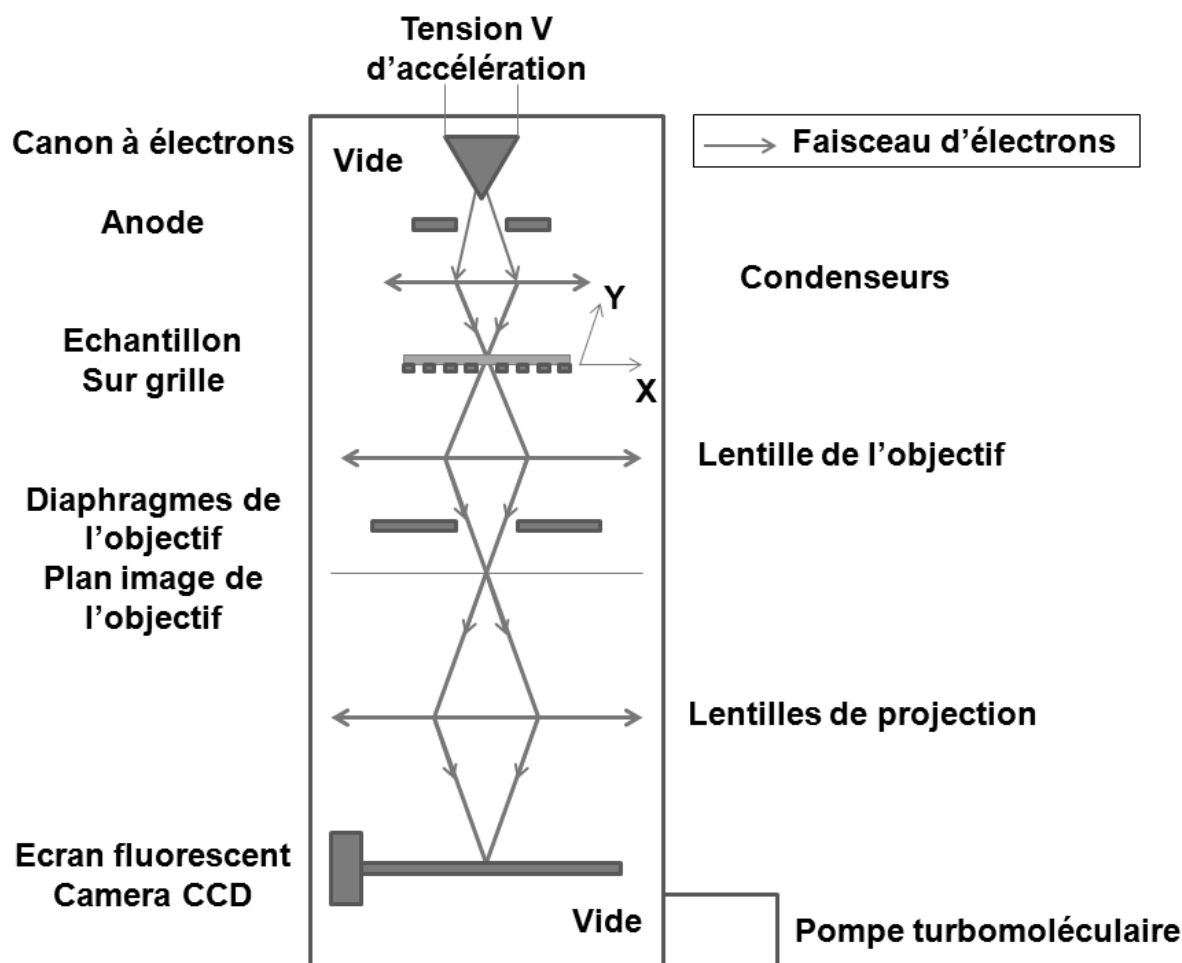


Figure A.4 : Eléments d'un Microscopie électronique à transmission (MET) (D'après Ghandbaja, 2008. www.scmen.uhp-nancy.fr/Cours MET v2008.pdf).

En bref, un canon à électrons (ou cathode) émet des électrons par effet joule. Le vide poussé ($10^{-4} - 10^{-7}$ hPa) permet un échauffement très élevé. Un champ électrique de 2 à 7 kV permet d'obtenir des électrons d'une faible variété énergétique, ainsi le faisceau est cohérent. Des condensateurs permettent de moduler la densité et l'ouverture du faisceau électronique qui éclaire l'échantillon. De manière similaire à des lentilles en verre, des lentilles électromagnétiques vont permettre de focaliser le faisceau sur l'échantillon. La focale de telles lentilles est inversement proportionnelle au champ magnétique dans l'entrefer, c'est-à-dire au courant d'excitation, et augmente avec la tension d'accélération V . Ceci permet un large éventail d'agrandissements que l'on ne possède pas en microscopie optique. L'objectif assure la mise au point sur l'échantillon. Les électrons du faisceau seront plus ou moins absorbés selon la nature, l'épaisseur et la densité de matière dans l'échantillon. Seuls les électrons qui traversent la matière seront analysés. Des diaphragmes permettent de garder une

A. Annexes

partie des faisceaux transmis. Le diaphragme objectif élimine les électrons diffusés avec un angle supérieur à l'angle d'ouverture de l'objectif et corrige les aberrations sphériques dues à la lentille de l'objectif. Enfin, un système de projection de 2 à 4 lentilles projette l'image de l'échantillon sur un écran fluorescent, capturée définitivement par un capteur CCD.

D'autre part, la résolution d'un MET devrait être de l'ordre du picomètre. Cependant, celle-ci est diminuée par des imperfections dans le système, comme l'aberration chromatique qui est liée à la dispersion d'énergie des électrons ; ceux-ci n'ont pas tous exactement la même longueur d'onde, en raison (i) de la dispersion propre au canon et (ii) des chocs inélastiques entre électrons du faisceau et électrons de l'échantillon. Il en résulte un disque comme image d'un point.

Le MET permet une observation de l'organisation interne de l'échantillon. L'épaisseur de celui-ci ne doit pas excéder quelques dizaines de nanomètres (≈ 90 nm) pour pouvoir être traversée par le faisceau incident. Une déshydratation est opérée pour des échantillons d'origine biologique. Par la suite, ils sont enrobés dans une résine suffisamment stable et transparente aux électrons. Les échantillons imprégnés sont alors découpés en couches ultrafines (microtomie) déposées sur des grilles en métaux lourds (or, palladium...). Par ailleurs, les ultrastructures d'intérêt doivent être contrastées par des atomes lourds suffisamment denses aux électrons pour les dévier vers le diaphragme d'objectif, comme le permettent des marquages au tetroxyde d'osmium OsO_4 et à l'acétate d'uranyl.

A noter également que la puissance électronique étant proportionnelle au carré de l'agrandissement, l'irradiation doit être suffisamment rapide à fort grossissement pour ne pas (trop) détériorer l'échantillon.

Annexe 6 : Analyse de texture d'image par la méthode de cooccurrence

Par cette méthode de calcul statistique sont mesurées des grandeurs statistiques qui rendent compte de la distribution des niveaux de gris des pixels au sein d'une image non-uniforme. Dans un premier temps, l'image « texturée » est convertie en format 8 bits, elle présente ainsi 256 différents tons de gris. L'image est ensuite décomposée en une matrice où chaque élément correspond à un pixel de niveau de gris $i, j, \dots, 0 < i, j, \dots < 256$. Le nombre de fois qu'un pixel i est adjacent à un pixel j est alors mesuré. Une matrice dite de cooccurrence peut alors être construite, où chaque élément représente la fréquence d'occurrence $P_{i,j}$. La direction et l'espacement entre les deux pixels peuvent être choisis (**Figure A.5**, sont considérés les pixels contigus dans le sens ouest \rightarrow est).

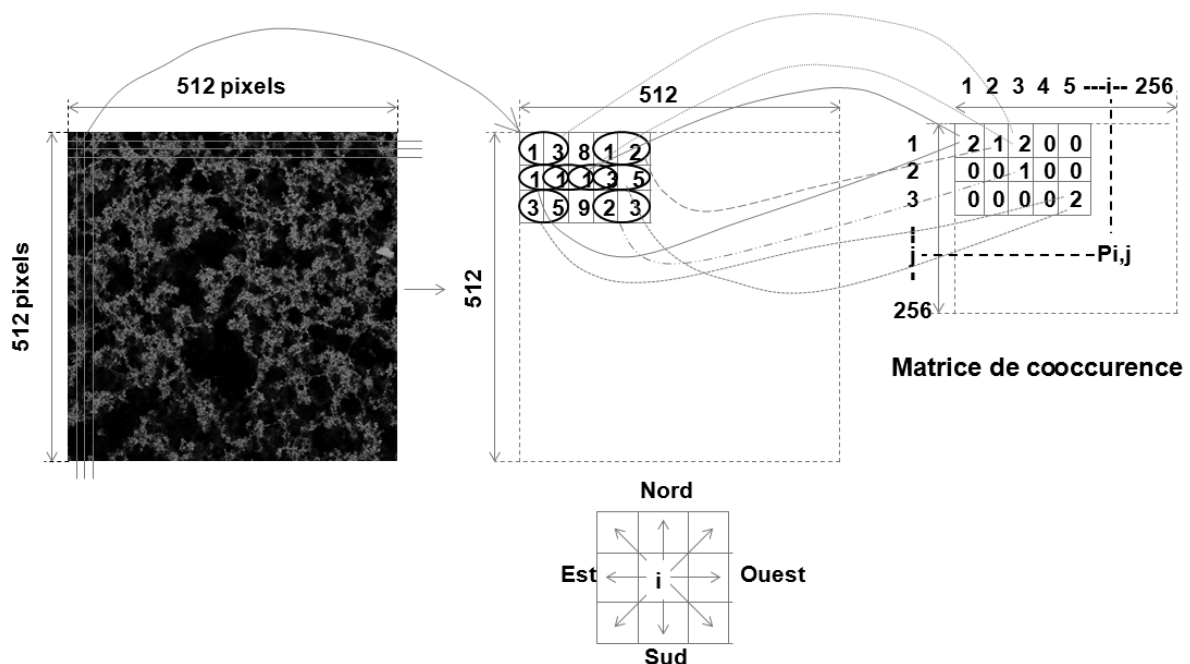


Figure A.5 : Principe de construction d'une matrice de cooccurrence à partir d'une image texturée I en 256 tons de gris, résolution 512x512 pixels (d'après The Mathworks - version 7.5.0.342 (R2007b)).

Sont alors calculés les paramètres suivants, d'après la classification de Haralick (1979) (**Table A.2**). Ceux-ci renseignent sur l'organisation spatiale des pixels (taille des zones de

A. Annexes

même intensité, présence d'« objets » plus ou moins grands, pores...) dans l'image étudiée. Ceux-ci sont décrits dans la **partie 3.2.2.3**. Les images analysées de la sorte peuvent alors être classifiées par ACP.

Table A.2 : Définition mathématique des paramètres de cooccurrence. $P_{i,j}$ correspond à la fréquence d'occurrence qu'un pixel d'intensité i est adjacent à un pixel j (**Equations (A.14)**) :

Paramètre calculé	Formule mathématique
« Contraste » - cont	$\text{cont} = \sum_{i,j} (i - j)^2 * P_{i,j}$
« Correlation » - corr	$\text{corr} = \sum_{i,j} \frac{(i - \mu_i) * (j - \mu_j) P_{i,j}}{\sigma_i * \sigma_j}$
« énergie » - en	$\text{en} = \sum_{i,j} (P_{i,j})^2$
« homogénéité » - homo	$\text{homo} = \sum_{i,j} \frac{P_{i,j}}{1 + i - j }$

Annexe 7 : Résonance magnétique nucléaire ^1H pour le séquençage de l'alginate

Les pics caractéristiques à 90°C et dans D_2O de l'alginate préhydrolysé (1%, m/m) sont identifiés pour des déplacements chimiques de 5.07 ppm (proton anomérique H-1 de G), 4.7 ppm (proton anomérique H-1 de M et proton H-5 de G adjacent à M) et 4.45 ppm (proton H-5 de G adjacent à G) (Grasdalen, 1979, 1983). Cependant, un début d'ébullition dans le tube RMN à 90°C nous a contraints à effectuer les mesures à 70°C, donnant dans le même ordre d'apparition que précédemment des pics à 5.52, 5.13 et 4.92 ppm, avec le pic d'eau résiduelle (dans le solvant D_2O) à 4.76 ppm (voir exemple de spectre **Figure A.6**).

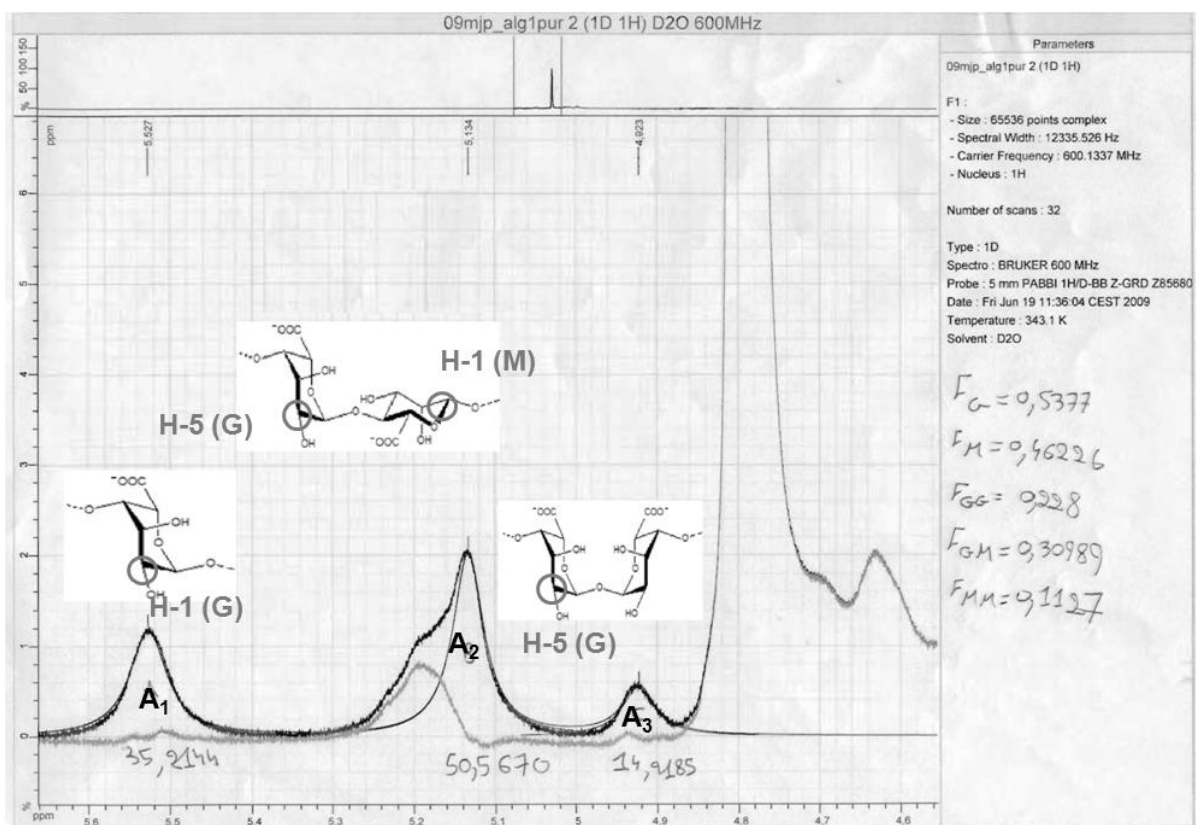


Figure A.6 : un exemple de spectre RMN ^1H dans D_2O et 70°C de l'alginate pré-hydrolysé. L'attribution des pics caractéristiques aux protons des monomères M et G est présentée (d'après Grasdalen, 1979,1983).

A. Annexes

Les spectres obtenus subissent d'abord une correction de la ligne de base, puis sont déconvolués pour permettre la mesure de l'aire sous les pics A_1 , A_2 et A_3 . Les différentes fractions en monomères et dimères de l'alginate sont ainsi quantifiées (**Equations (A.15)**):

$$F_G = \frac{A_1}{A_2 + A_1}$$

$$F_{GG} = \frac{A_3}{A_2 + A_3}$$

$$F_M + F_G = 1$$

$$F_{MG} = F_{GGM} + F_{GG}$$

$$F_{GG} = F_{GGG} + F_{GGM}$$

$$F_G = 1 - 2 \times F_{MG} + F_{MGM}$$

(Eq. A.15)

(Pour en savoir plus...)

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- AACC 46-23. (1982). Approved methods of the American association of cereal chemists (8th ed). St. Paul, MN.
- Adachi, M., Takenaka, Y., Gidamis, A. B., Mikami, B., & Utsumi, S. (2001). Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *Journal of Molecular Biology*, *305*, 291-305.
- Alonso, R., Oruá, E. & Marzo, F. (1998). Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. *Food Chemistry*, *63*, 505-512.
- Alting, A.C., Hamer, R. J., de Kruif, C. G., & Visscher, R. W. (2003). Cold-set globular protein gels: interaction, structure and rheology as a function of protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3150-3156.
- Asakura, S. & Oosawa, F. (1954). On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. *Journal of Chemical Physics*, *22*, 1255-1256.
- Asakura, S. & Oosawa, F. (1958). Interaction between particles suspended in a solution of Macromolecules. *Polymer Science*, *33*, 183-192.
- AOAC International, Method 920.87 (1990). In *Official methods of analysis of AOAC International*, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, VA, USA.
- Atkins, E. D. T., Mackie, W., Parker, K. D., & Smolko, E. E. (1971). Crystalline structures of poly D-mannuronic and poly-L-guluronic acids. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Letters*, *9*, 311-316.
- Barbut, S. & Foegeding, E. A (1993). Ca²⁺-induced gelation of preheated whey protein isolate. *Journal of Food Science*, *58*, 867-871.
- Batista, A. P., Portugal, C. A. M., Sousa, I., Crespo, J. G. & Raymundo, A (2005). Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, *36*, 135-143.
- Beaulieu, M., Turgeon, S., & Doublier, J.-L (1999). Rheology, texture and microstructure of whey proteins-low methoxypectins mixed gels with added calcium ions. *International Dairy Journal*, *11*, 961-967.
- Bourriot, S., Garnier, C., & Doublier, J.-L. (1999_a). Micellar casein - κ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. *Carbohydrate polymers*, *40*, 145-157.
- Bourriot, S., Garnier, C., & Doublier, J.-L. (1999_b). Phase separation, rheology and structure of micellar casein-galactomannan mixtures. *International Dairy Journal*, *9*, 353-357.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse Proteins: Processing, Characterization, Functional Properties and Applications in Food and Fed. *Food Research International*, *43*, 414-431.
- Braccini, I., Grasso, R. P., & Perez, S. (1999). Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydrate Research*, *317*, 119-130.

Références bibliographiques

- Braccini, I. & Perez, S. (2001). Molecular Basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*, 2, 1089-1096.
- Bryant, C. M. & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 143-151.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering* 104, 467-483.
- Butler, M. F. & Heppenstall-Butler, M. (2003). Phase separation in gelatin/dextran and gelatin/maltodextrin mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17, 815-830.
- Campbell, L. J., Gu, X., Dewar, S. J., & Euston, S. R. (2009). Effects of heat treatment and glucuno- δ -lactone induced acidification on characteristics of soy protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 23, 344-351.
- Carlsson-Kanyama, A., Ekström, M. P., & Shanahan, H. (2003). Food and life cycled inputs: consequences of diet and ways to increase efficiency. *Ecological Economics*, 00, 1-15.
- Casey, R. D. (1979). Immunoaffinity chromatography as a means of purifying legumin from *Pisum sativum*. *Biochemistry Journal*, 177, 509-520.
- Casey, R. (1982). The Genetics of Pea Storage Proteins. *Qualitas Plantarum- Plant Foods for Human Nutrition*, 31, 281-295.
- Casey, R., Sharman, J. E., Wright, D. J., Bacon, J. R., & Guldager, P. (1982). Quantitative variability in Pisum seed globulins: its assessment and significance. *Qualitas Plantarum- Plant Foods for Human Nutrition*, 31, 333-346.
- Cavallieri, A. L. F. & da Cunha, R. L. (2008). The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold-set gelation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 22, 439-448.
- Cayot, P. & Lorient, D (1998). In *Structure et technofonctions des protéines du lait*. Technique et Documentation Lavoisier (Eds), Arilait Recherche : Paris.
- Chandler, P.M, Higgins, T. J. V., Randall, J., & Spencer, D. (1983). Regulation of Legumin Levels in Developing Pea Seeds under Conditions of Sulfur Deficiency. *Plant Physiology*, 71, 47-54.
- Chen, H. & Chakrabarti. Hydrodynamic effects on domain growth in off-Critical Polymer Blends, *Journal of Chemical Physics*, 108, 6897-6905.
- Choi, S.-M. & Ma, C.-Y. (2005). Conformational study of globulin from common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8046-8053.
- Choi, S.-M. & Ma, C.-Y. (2006). Study of thermal aggregation of globulin from common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by size-exclusion chromatography and laser light scattering.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 554-561.

Références bibliographiques

- Clare, K. (1993) Algin. In Whistler, R. L. & BeMiller, J. N. (Eds), *Industrial Gums and Their Derivates.*, Academic Press, Inc.: 105-144.
- Clark, A. H. (1995). Kinetics of demixing. In S. E. Harding, S. E. Hill & J. R. Mitchell (Eds), *Biopolymer mixtures*, Nottingham University Press: 37-64.
- Clark, A.H., Kavanagh, G.M., & Ross-Murphy, S.B. (2001). Globular protein gelation : theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 15, 383-400.
- Clark, A.H. & Lee-Tuffnell, C. D. (1986). Gelation of globular protein. In . Mitchell, J.R. (Ed.), *Functional properties of food macromolecules*. Elsevier Applied Science, London: 203-272.
- Croguennoc, P., Durand, D., & Nicolai, T. (2001). Phase separation and association of globular protein aggregates in the presence of polysaccharides: 1. Mixtures of Preheated β -lactoglobulin and κ -carrageenan at Room temperature. *Langmuir*, 17, 4372-4379.
- Croy, R. R. D.; Gatehouse, J. A., Tyler, M., & Boutler, D. (1980). The Purification and Characterization of a Third Storage Protein (Convicilin) from the Seeds of Pea (*Pisum sativum* L.). *Biochemistry Journal*, 191, 509-516.
- Damodaran, S. (1989). Influence of protein conformation on its adaptability under chaotropic conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 11, 2-8.
- Danielson, C. E. (1949). Seed globulins of the gramineae and leguminosae. *European Biochemistry Journal*, 44, 387-400.
- Davis, J., Sonesson, U., Baumgartner, D. U. & Nemecek, T. (2009). Environmental impact of four meals with different protein sources : cases studies in Spain and Sweden. *Food Research International*, 43, 1874-1884.
- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A Review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37, 4311-4330.
- De Bont, P. W., van Kempen, G. M. P., & Vreeker, R. (2002). Phase separation in milk protein and amylopectin mixtures. *Food Hydrocolloids*, 16, 127-138.
- De Bont, P. W., Hendricks, C. L. L., van Kempen, G. M. P., & Vreeker, R. (2004). Time evolution of phase-separating milk protein and amylopectin mixtures. *Food Hydrocolloids*, 18, 1023-1031.
- De Jong, S., Klok, H. J., & van de Velde, F. (2009). The mechanism behind microstructure formation in mixed whey protein-polysaccharide cold-set gels. *Food Hydrocolloids*, 23, 755-764.
- De Kruif, C. & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide-protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, 555-563.
- Dentini, M., Rinaldi, G., Risica, D., Barbetta, A., & Skjak-Braek (2005). Comparative studies on solution characteristics of mannuronan epimerized by C-5 epimerases. *Carbohydrate Polymers*, 59, 489-499.

Références bibliographiques

- Derbshyre, E., Wright, D. J., & Boutler, D. (1976). Legumin and vicilin storage proteins of legume seed. *Phytochemistry*, *15*, 3-24.
- Dische, Z. (1947). A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry*, *167*, 189-198.
- Donati, I., Holtan, S., Mørch, Y. A., Borgogna, M., Dentini, M., & Skjak-Bræk, G. (2005). New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules*, *6*, 1031-1040.
- Donato, L., Garnier, C., Novalés, B., Durand, S., & Doublier, J.-L. (2005). Heat-induced gelation of bovine serum albumin/low-methoxyl pectin systems and the effect of calcium ions. *Biomacromolecules*, *6*, 374-385.
- Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D., & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *5*, 1-13.
- Draget, K. I. & Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, *25*, 251–256.
- Dutilh, C. E. & Kramer, K. J. (2000). Energy consumption in the food chain – comparing alternative options in food production and consumption. *AMBIO*, *29*, 98-101.
- Edmond, E. & Ogston, A.G. (1968). An approach to the study of phase separation in ternary aqueous systems. *Biochemistry Journal*, *109*, 569-576.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives Biochemistry Biophysics*, *82*, 70-77.
- Emmert, J. L. & Baker, D. H. (1995). Protein quality assessment of soy products. *Nutrition Research*, *15*, 1647-1656.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Philips, G. O., Nishinari, K., Funami, T., Williams, P. A. & Li, L. (2007). Multiple Steps and Critical Behavior of the Binding of Calcium to Alginate. *Journal of Physics and Chemical B*, *111*, 2456-2562.
- Foegeding, E.A., Bowland, E.L., & Hardin, C.C. (1995). Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. *Food, Hydrocolloids*, *9*, 237-249.
- Fredrikson, M., Biot, P., Marie Larsson Alminger, M. L., Carlsson, N.-G., & Sandberg, A.-S. (2001). Production Process for High-Quality Pea-Protein Isolate with Low Content of Oligosaccharides and Phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 1208-1212.
- Fuhrmeister, H. & Meuser, F. (2003). Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. *Journal of Food Engineering*, *56*, 119-129.
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakaurna, M., Draget, K. I., Nishinari, K. & Philips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids* *23*, 1746-1755.

Références bibliographiques

- Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D., & Boutler, D. (1980). Isoelectric-focusing and Carbohydrate Content of Pea (*Pisum sativum L.*) Legumin. *Biochemistry Journal*, *185*, 497-503.
- Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D., Morton, H., Tyler, M., & Boutler, D. (1981). Characterization and Subunits Structures of the Vicilin Storage Proteins of Pea (*Pisum sativum L.*). *European Journal of Biochemistry*, *118*, 627-633.
- Gatehouse, J. A., Lycett, G. W., Croy, R. R. D., & Boutler, D. (1982). The Post-Translational Proteolysis of the Vicilin from Pea (*Pisum sativum L.*). *Biochemistry Journal*, *207*, 629-632.
- Gatehouse, J. A. Croy, R. R. D., & Boutler D. (1984). The synthesis and Structure of Pea Storage Proteins. *Plant Science*, *1*, 287-314.
- Gilsenan, P. M.; Richardson, R. K. & Morris, E. R. (2003). Associative and segregative interactions between gelatin and low-methyl pectin. Part 2- co-gelation in the presence of Ca^{2+} . *Food Hydrocolloids*, *17*, 739-749.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. D., & Thom, D (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS letters*, *32*, 195-198.
- Grinberg, V.Y. & Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, *11*, 145-158.
- Grasdalen, H., Larsen, B., & Smidsrød, O. (1979). A p.m.r. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydrate Research*, *68*, 23-31.
- Grasdalen, H. (1983). High field 1H NMR spectroscopy of alginate. *Carbohydrate Research*, *118*, 255-260.
- Gregor, J. E. Fenton, E., Brokenshire, G., Van den Brink, P., & O'Sullivan, B. (1996). Interactions of calcium and aluminium ions with alginate. *Water Research*, *30*, 1319-1324.
- Grillet, A. M., Wyatt, N. B., & Gloe, L. M. (2012). Polymer Gel Rheology and Adhesion. J. Vicente (Eds), in *Rheology: Intech* : 59-80. www.intechopen.com/books/rheology/rheology-and-adhesion-of-polymer-gels.
- Guéguen, J. (1983). Legume seed extraction, processing and end product characteristics. *Qualitas Plantarum- Plant Foods for Human Nutrition*, *32*, 267-303.
- Guéguen, J., Vu, A. T., Schaeffer, F. (1984). Large-scale purification and characterization of pea globulins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *35*, 1024-1033.
- Hall, J. L. (1991). PATAg test for polyosaccharides. In C. Hawes (Ed.), *Electron microscopy of plant cells*. London, Academic Press: 35-39.
- Haralick, R. M. (1979). Statistical and structural approaches to texture. *Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, *3*, 610-621.
- Haug, A. (1961). The affinity of some divalent metals to different types of alginates. *Acta Chemical Scandinavia*, *15*, 1794-1795.

Références bibliographiques

- Haug, A., Larsen, B., & Smidsrød, O (1967). Studies on the sequence in alginate from different sources. *Acta Chemical Scandinavia*, 21, 217-225.
- Haug, A., Larsen, B., & Smidsrød, O (1974). Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research*, 32, 217-225.
- Haug, A. & Smidsrød, O. (1965_a). The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions. I. Calcium Ions. *Acta Chemical Scandinavia*, 19, 329-340.
- Haug, A. & Smidsrød, O. (1965_b). The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions. II. Comparison of different Metal Ions. *Acta Chemical Scandinavia*, 19, 341-351.
- Hoffman, M. A. M., & van Mil, P. J. J. M (1997). Heat-induced Aggregation of α -lactoglobulin: Role of the free thiol group and disulphide bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2942-2948.
- Hong, G. P. & Chin, K. B. (2010). Evaluation of sodium alginate and glucono- δ -lactone levels on the cold-set gelation of porcine myofibrillar proteins at different salt concentrations. *Meat Science*, 85, 201-209.
- Hongsprabhas, P., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (1999). The structure of cold-set whey protein isolate gels prepared with Ca^{2+} . *LWT – Food Science and Technology*, 32, 196-202.
- Hongsprabhas, P. & Barbut, S. (1998). Ca^{2+} -induced cold gelation of whey protein isolate: effect of two-stage gelation. *Food Research International*, 30, 523-527.
- Iain, C. M. D. (1993). Conformational origin of polysaccharide solution and gel properties. In Whistler, R. L. & BeMiller, J. N. (Eds), *Industrial Gums and Their Derivates*. Academic Press, Inc.: 21-52.
- Jackson, P., Boutler, D., & Thurman, D. A. (1969). A comparison of some properties of vicilin and legumin isolated from seeds of *Pisum sativum*, *Vicia faba* and *Cicer arietinum*. *New Phytology*, 68, 25-33.
- Jolliffe, I. T. (2002). In *Principal Component Analysis*, Springer (2nd edition).
- Jørgensen, E., Sletmoen, M., Draget, K. I. & Stokke, B. T. (2007). Influence of oligoguluronates on alginate gelation, kinetics and polymer organization. *Biomacromolecules*, 8, 2388-2397.
- Ju, Z. Y. & Kilara, A (1998_a). Effects of preheating on properties of aggregates and of cold-set gels of whey proteins isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3604-3608.
- Ju, Z. Y. & Kilara, A. (1998_b). Properties of gels induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant from calcium-ion aggregated whey protein isolate. *Journal of Dairy Science*, 81, 1236–1243.

Références bibliographiques

- Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., & Utsumi, S. (2008). Comparison of Physicochemical Properties of 7S and 11S Globulins from Pea, Fava Bean, Cowpea and French Bean with Those of Soybean – French Bean 7S Globulin exhibits Excellent Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10273-10279.
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 64, 763-767.
- Klein, R., & Nägele, G. (1996). Static and dynamic scattering by concentrated systems: theory. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1, 4-10.
- Klemmer, K. J., Waldner, L, Stone, A., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2012). Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chemistry*, 130, 710-715.
- Koyoro, H. & Powers, J. R. (1987). Functionnal properties of pea globulin fractions. *Cereal Chemistry*, 64, 97- 101.
- Kuhn, K. R., Cavallieri, A. F. L., & da Cunha, R. L. (2011). Cold-set whey protein-flaxseed gum gels induced by monovalent and bivalent salt addition. *Food Hydrocolloids*, 25, 1302-1310.
- Langton, M. & Hermansson, A. M. (1992). Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*, 5, 523-539.
- Lai, L.-S. & Chiang, H.-F. (2002). Rheology of decolorized hsian-tsoa leaf gum in the dilute domain. *Food Hydrocolloids*, 16, 427-440.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lakemond, C. M. M., de Jongh, H. J. H, Pâques, M., van Vliet, Gruppen, H. & Voragen, A (2003). Gelation of soy glycinin; influence of pH and ionic strength on network structure in relation to protein conformation. *Food Hydrocolloids*, 17, 365-377.
- Li, X., Li, Y., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C., & Cui, S. (2007). Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins. *Food Chemistry*, 104, 1410-1417.
- Li, X., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C., & Cui, S. (2008). Phase behaviour and microstructure of preheated soy proteins and κ -carrageenan mixtures. *Food Hydrocolloids*, 22, 845-853.
- Liu, X., Qian, L., Shu, T., & Tong, Z. (2003). Rheology and characterization of sol-gel transition in aqueous alginate solutions induced by calcium cations through in situ release. *Polymer*, 44, 407-412.
- Liu, S., Nicholas, H. L., Nickerson, M. T. (2009). Effect of pH, salt and biopolymer ratio on the formation of pea protein isolate – gum Arabic complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1521-1526.
- Lundqvist, J., Barron, J., Berndes, G., Berntell, A., Falkenmark, M., Karlberg, L., & Rockström, J. (2007). Water pressures and increases in food & bioenergy demand

Références bibliographiques

- implications of economic growth and options of decoupling. In *Scenarios of economic growth and resource demand*, Swedish Environmental Advisory Council memorandum: 1.
- Maltais, A., Remondetto, G. E. Gonzalez, R., & Subirade, M. (2005). Formation of Soy Protein Isolate Cold-set Gels: Protein and Salt Effects. *Journal of Food Science*, 70, 67-73.
- Maltais, A., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2008). Mechanisms involved in the formation and structure of cold-set gels: A molecular and supramolecular investigation. *Food Hydrocolloids*, 22, 550-559.
- Maltais, A., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2009). Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds. *Food Hydrocolloids*, 23, 1647-1653.
- Marangoni, A. G., Barbut, S., McGauley, S. E., Marcone, M., & Narine, S. S. (2000). On the structure of particulate gels – the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 14, 61-74.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998_a). Salt-Soluble Seed Globulins of Dicotyledonous and Monocotyledonous plants – I: Isolation, Purification and Characterization. *Food Chemistry*, 62, 27-47.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998_b). Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various dicotyledonous and monocotyledonous globulin seed storage proteins. *Food Chemistry*, 63, 85-95.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998_c). Salt-Soluble Seed Globulins of Dicotyledonous and Monocotyledonous plants – II: Structural Characterization. *Food Chemistry*, 63, 265-274.
- Marcone, M. F. (1999). Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Research International*, 32, 79-92.
- Matta, K. N., Gatehouse, J. A., & Boutler, D. (1981). Molecular and subunit heterogeneity of legumin of *Pisum sativum* (garden-pea) – a multidimensional electrophoretic study. *Journal of Experimental Botany*, 32, 1295-1307.
- Melton, L. D. & Smith, B. G. (2001). In *Determination of the Uronic Acid Content of Plant Cell Walls Using a Colorimetric Acid*. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Wiley, J. and Sons, Inc, E.3.3.1-E.3.3.4.

Références bibliographiques

- Meng, G. T. & Ma, C. Y. (2001). Thermal properties of of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. *Food Chemistry*, 73, 453-460.
- Montejano, J. G., Haman, D. D., & Lanier, T. C. (1985). Comparison of two instrumental methods with sensory texture of protein gels; *Journal of Texture Studies*, 16, 403-
- Morris, E. R., Rees, D. A., Thom, D., & Boyd, J. (1978). Chiroptical stoichiometric evidence of a specific, primary dimerization process in alginate gelation. *Carbohydrate Research*, 66, 145–154.
- Neiser, S., Draget, K.I. & Smidsrød, O. (1999). "Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems. *Food Hydrocolloids*, 13, 445-458.
- Newbiggin, E. J., de Lumen, B. O., Chandler, P. M., Gould, A., Blagrove, R. J., March, J. F., Kortt, A. A., & Higgins, T. J. V. (1990). Pea convicilin: structure and primary sequence of the protein and expression of a gene of transgenic tobacco. *Planta*, 180, 461-470.
- Nikolopoulou, D., Grigorakis, K., Stasini, M., Alexis, M. N., & Iliadis, K. (2007). Differences in chemical composition of field pea (*Pisum sativum* L.) cultivars: Effects of cultivation area and year. *Food Chemistry*, 103, 847–852.
- Norton, I.T. & Frith, W. J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15, 543-553.
- Nussinovitch, A. (1997). Alginates. In Chapman & Hall (Eds), *Hydrocolloid Applications: Gum technology in the food and other industries*. London, Blackie Academic and Professional: 19-39.
- O’Kane, F., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & van Boekel, M. A. J. S. (2004_a). Characterization of pea vicilin. 1. Denoting convicilin as the α -subunit of the *Pisum* Vicilin Family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3141-3148.
- O’Kane, F.; Happe, R. P.; Vereijken, J. M.; Gruppen, H., & van Boekel, M. A. J. S. (2004_b). Characterization of Pea Vicilin. 2. Consequences of compositional heterogeneity on heat-induced gelation behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3149-3154.
- O’Kane, F., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & van Boekel, M. A. J. S. (2004_c). Heat-induced gelation of pea legumin: Comparison with soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5071-5078.
- O’Kane, F. E., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & van Boekel, M. A. J. S. (2005). Gelation behavior of protein isolates extracted from 5 cultivars of *Pisum sativum* L. *Journal of Food Science*, 70, 132-137.
- Osborne, T. B. & Campbell, G. F. (1898). Proteins of the pea. *Journal of American Chemical Society*, 20, 348-362.
- Paddock, S. W. (2000). Principles and practice of laser scanning confocal microscopy. *Molecular Biotechnology*, 16, 127-149.

Références bibliographiques

- Park, H. G., Kim, T. W., Chae, M. Y., & Yoo, I.-K. (2007). Activated carbon-containing alginate adsorbent for the simultaneous removal of heavy metals and toxic organics. *Process Biochemistry*, *42*, 1371–1377.
- Pedrosa, C., Trisciuzzi, C., & Ferreira, S. T. (1997). Effects of glycosylation on functional properties of vicilin, the 7S storage globulin from pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2025-2030.
- Pepperman, A. B. & Kuan, J.-C. W. (1995). Controlled release formulations of alachlor based on calcium alginate. *Journal of Controlled Release*, *34*, 17-23.
- Pires Vilela, J. A., Cavallieri, A. L. F., & da Cunha, R. L. (2011). The influence of gelation rate on the physical proprieties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate-gellan gum. *Food Hydrocolloids*, *25*, 1710-1718.
- Plietz, P., Damaschun, G., Muller, J., & Schwenke, K. D. (1983). The structure of the 11S globulin from sunflower and rape seed. A small-angle X-ray study. *European Journal of Biochemistry*, *130*, 315-320.
- Rangel, A., Domont, G. B., Pedrosa, C., & Ferreira, S. T. (2003). Functional Properties of Purified Vicilins from Cowpea (*Vigna unguiculata*) and Pea (*Pisum sativum* L.) and Cowpea Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 5792-5797.
- Rehman, Z.-U. & Shah, W. H. (2005). Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*, *91*, 327–331.
- Reijnders, L. & Soret, S. (2003). Quantification of the environmental impact of different dietary protein choices. *American Journal of Clinical Nutrition*, *78*, 664S-668S.
- Relkin P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, *36*, 565-601.
- Renkema, J. M. S., Lakemond, C. M. M., de Jongh, H. H. J., Gruppen, H., & van Vliet, T. (2000). The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. *Journal of Biotechnology*, *79*, 223-230.
- Renkema, J. M. S., Knabben, J. H. M., & van Vliet, T. (2001). Gel formation by β -conglycinin and glycinin and their mixtures. *Food Hydrocolloids*, *11*, 407-414.
- Riblett, A. L., Herald, T. J., Schmidt, K. A., & Tilley, K. A. (2001). Characterization of beta-conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4983-4989.
- Rocher, V. (2008). Synthèse et caractérisation de billes d'alginate magnétiques pour l'élimination de polluants organiques dans les effluents par séparation magnétique. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie : Paris 6.

Références bibliographiques

- Rosenthal, A. J. (1999). In *Food texture, measurements and perception*. Aspen publishers, Gaithersburg, USA.
- Savage, G. P. & Deo, S. (1989). The nutritional value of peas (*Pisum sativum* L.). A literature review. *Nutrition Abstract and Review (Series A)*, 59, 65-87.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S. & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polyoside complexes: a review. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 38, 689-753.
- Schorsch, C.; Jones, M. G., & Norton, I. T. (1999). Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13, 89-99.
- Schroeder, H. E. (1984). Major albumins of *Pisum* cotyledons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 191-198.
- Semenova, M. G. & Savilova, L. B. (1998). The role of biopolymer structure in interactions between unlike biopolymers in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 12, 65-75.
- Shand, P. J.; Ya, H., Z. Pietrasik Z., & Wanasundara, P. K. J. P. D. (2007). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chemistry*, 102, 1119-1130.
- Simonet, F., Garnier, C., & Doublier, J.-L. (2000). Partition of proteins in the aqueous guar/dextran two-phase system. *Food Hydrocolloids*, 14, 591-600.
- Smisrød, O. & Haug, A. (1971). Estimation of the relative stiffness of the molecular chain in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strengths. *Biopolymers*, 10, 1213-1227.
- Smidsrød, O., Glover, R. M., & Whittington, S. G. (1973). The relative extension of alginates having different chemical composition. *Carbohydrate Research*, 27, 107-118.
- Spencer, D., Chandler, P.M, Higgins, T. J. V., Inglis, A. S., & Rubira, M. (1983). Sequence interrelationships of the subunits of vicilin from pea seeds. *Planta Molecular Biology*, 2, 259-267.
- Sperry, P. R. (1984). Morphology and mechanism in latex flocculated by volume restriction. *Journal of Colloid and Interface Science*, 99, 97-108.
- Speyer, R. F. (1994). In *Thermal analysis of materials*. Marcel Dekker, New York.
- Steiner, T., Mosenthin, A., Zimmermann, B., Greiner, R., & Roth, S. (1980). Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 13, 297-335.
- Subirade, M., Guéguen, J., & Schwenke, K. D. (1992). Effect of Dissociation and Conformational Changes on the Surface Behavior of Pea Legumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 152, 442-454.

Références bibliographiques

- Sun, X. D. & Arntfield, S. D. (2010). Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. *Food Research International*, *43*, 509-515.
- Sun, X. D. & Arntfield, S. D. (2011). Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate induced by heat treatment: Effect of heating and cooling rate. *Food Chemistry*, *124*, 1011-1016.
- Sun, X. D. & Arntfield, S. D. (2012). Molecular forces involved in heat-induced pea protein gelation: effects of various reagents on the rheological properties of salt-extracted pea protein gels. *Food Hydrocolloids*, *28*, 325-332.
- Svedberg, T., Pedersen, K. O., & Bauer, J. H. (1940). In *The ultracentrifuge*. Clarendon Press, Oxford.
- Syrbe, A., Fernandes, P.B., Dannenberg, F.; Bauer, W., & Klostermeyer, H. (1995). Whey proteins + polysaccharide mixtures: polymer and incompatibility and its applications. In E. Dickinson & D. Lorient Editions. *Food Macromolecules and colloids*: Cambridge UK Royal Society of Chemistry, 328-339.
- Syrbe, A., Bauer, J., & Klostermeier, H. (1998). Polymer science concept in dairy systems – An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, *8*, 179-193.
- Tandang-Silvas, M. R. G., Fukuda, T., Fukuda, C., Prak, K., Cabanos, C., Kimura, A., Itoh, T., Mikami, B., Utsumi, S., & Maruyama, N. (2010). Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1804*, 1432-1442.
- Tanford, C., Bunville, L. G. & Nozaki, Y. (1959). "The reversible transformation of β -Lactoglobulin at pH 7.5." *Journal of America Chemical Society*, *81*, 4032-4036.
- Tang, C.-H., Chen, L., & Ma, C.-Y. Thermal aggregation, amino acid composition and in vitro digestibility of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: a comparative study. *Food Chemistry*, *113*, 957-963.
- Tolstoguzov, V. B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In J. R. Mitchell & D. A. Ledward (Eds). *Functional Properties of Food Macromolecules*. Elsevier Applied Sciences, London: 385-415.
- Tolstoguzov, V. B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, *4*, 429-468.
- Tolstoguzov, V. B. (1995). Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocolloids*, *9*, 317-332.
- Tömösöki, S., Lasztity, R., Haraszi, R. & Baticz, O (2001). Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Food/Nahrung*, *45*, 399-401.
- Tuinier, R., Rieger, J. & De Kruif, C. G. (2003). Depletion-induced phase separation in colloid-polymer mixtures. *Advances in Colloid and Interface Science*, *103*, 1-31.
- Turgeon, S. L. & Beaulieu, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *15*, 583-591.

Références bibliographiques

- Tzitzikas, E. N., Vincken, J.-P., de Groot, J., Gruppert, H., & Visser, R. G. F. (2006). Genetic Variation in Pea Seed Globulin Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 425-433.
- Rosenthal, A. J. (1999). In *Food texture, measurements and perception*. Aspen, Gaithersburg, USA.
- USDA (2009). Soy stats 2009, a reference guide to important soybean facts and figures. Soystats.com Web site.
- Valla, S., Li, J., Ertesvag, H., Barbeyron, T. & Lindahl, U. (2001). Hexuronyl C₅-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. *Biochimie*, *83*, 819-830.
- Verhaegh, N. A. M, Van Duijneveldt, J. S., Dhont, J. K. G. & Lekkerkerker, H. N. W. (1996). Fluid-fluid phase separation in colloid-polymer mixtures studied with small angle light scattering and light microscopy. *Physica A*, *230*, 409-406.
- Vitabora (2008). Vers le développement d'une alternative biosanitaire. *Vitabora News*, *9*, 6-7.
- Vitanews (2010). Qualivivant : Des résultats très encourageants. *Vitanews* , *32*, 8.
- Vold, I. M. N., Kristiansen, K. A., & Christensen, B. E. (2006). A Study of the Chain Stiffness and Extension of Alginates, in Vitro Epimerized Alginates, and Periodate-Oxidized Alginates Using Size-Exclusion Chromatography Combined with Light Scattering and Viscosity Detectors. *Biomacromolecules*, *7*, 2136-2146.
- Wang, Z.-Y.; Zhang, Q.-Z.; Konno, M., & Saito, S. (1993). Sol-gel transition of alginate solution by the addition of various divalent cations: ¹³C NMR spectroscopy Study. *Biopolymers*, *33*, 703-711.
- Wang, X., Warkentin, T. D., Briggs, C. J., Oomah, B. D., Campbell, C. G., & Woods, S. (1998). Trypsin Inhibitor Activity in Field Pea (*Pisum sativum* L.) and Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2620-2623.
- Whistler, R. L. (1993). Introduction to industrial gums. In Whistler, R. L. & BeMiller, J. N. (Eds), *Industrial Gums – Polysaccharide and their derivatives.*, Academic Press, Inc., London: 1-19.
- Ye, H. (2006). Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography–multiangle laser light scattering *Analytical Biochemistry*, *356*, 76-85.

Point final

Cette étude a été financée par le Ministère français de l'Economie, des Finances et de l'Industrie (Direction Générale des Entreprises), ainsi que la communauté d'agglomération du Grand Dijon. Merci à ces institutions d'investir sur des projets de recherche à long terme, qui misent sur un développement plus durable et plus raisonné de nos sociétés.

Maintenant, évoquons le cadre et les protagonistes de cette histoire de trois ans (et demi) !

Tout d'abord, je ferai une brève allusion à mes anciens tuteurs de stage de recherche dans les cadres de la deuxième année d'école d'ingénieurs (ex-ENSBANA) et en master M2, MM A. Chmura et N. Desbois. Tous deux chimistes organiciens, ceux sont eux qui m'ont donné le goût de l'expérimentation et du suspens qui en découle. Ils m'ont inculqué l'essence même de cette activité d'investigations :

Un matin, après avoir laissé tourné une manipe quelque peu coriace toute la nuit, je demande : « -Alors ça a marché ? Et on me répond : – Non. – On fait quoi alors ? - Eh bien on cherche... ».

Une phrase, peut-être à l'origine d'une vocation...

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères au Pr. R. Saurel, réalisateur et coordinateur de ce projet ambitieux, qui m'a accordé sa confiance et une grande liberté de mouvement dans la conduite du plan d'investigations. Par ses conseils avisés, il a su replacer mes idées à des moments décisifs et m'éviter des divagations qui m'auraient fait perdre un temps précieux. Soyons réalistes ! Il faut savoir doser son zèle.

Toute ma gratitude s'adresse ensuite à A. Assifaoui, MCF et co-réalisateur de ce projet, pour sa disponibilité, ses largesses d'esprit et son soutien moral. Sa patience, son calme et son côté apaisant m'ont été d'une grande aide dans les phases de doute. Je me dois de remercier pour les mêmes raisons C. Lafarge.

Je remercie également le Pr. P. Cayot, à l'époque directeur de l'ex-Equipe EMMA, pour m'avoir accueilli dans le laboratoire. Grand instigateur des sources protéiques alternatives au sein du laboratoire, il a su témoigner un vif intérêt pour notre projet commun.

Il suffit quelques fois de deux-trois phrases pour vous éclaircir l'esprit ou vous redonner le moral : « Le végétal, c'est l'avenir ! »

Je tenais à éprouver spécialement toute ma gratitude pour M. Prost, PDG des Laboratoires Spiral, qui a conféré à notre étude un aspect applicatif et donc prometteur (à creuser...), ainsi qu'à son soutien indéfectible dans la poursuite de nos investigations.

A Mmes M. Subirade et L. Donato, vous qui me faites l'honneur de juger ce présent travail, veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance profonde. Au Pr. T. Nicolai, vous qui avez accepté de consacrer du temps à la lecture et à l'appréciation de cette présente étude, veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect. Au Pr. C. Sanchez, merci d'avoir été membre du comité de thèse et de présider la soutenance de thèse.

Evidemment une période de thèse est parsemée de difficultés, voire en forçant le trait, de réclusion. « *C'est pas facile* » dirait-on benoîtement. Par chance, son entourage se montre très compréhensif et peut aider à surmonter quelques passages à vide, à savoir :

- Sa poignée d'amis que l'on garde après les études. Merci à eux de vous changer les idées et de vous renseigner sur la tournure que prend le monde. On en vient à dire : « *Ce n'est pas si évident, mais il faut croire en l'avenir !* »
- Son amoureux. En effet, une idylle peut débiter en même temps qu'une thèse. Et je me dois de remercier à nouveau mon directeur de thèse d'avoir permis par une heureuse coïncidence la rencontre entre Lisa, étudiante Erasmus à la base, et moi-même. « *Construit pour durer* », comme se vantait une marque d'électroménager. Il n'est pas courant de tomber sur une personne ô combien chère, particulièrement patiente et intentionnée en toutes circonstances. Et cela même quand vous n'êtes pas forcément d'une humeur très communicative. « *Qu'est ce tu as fait aujourd'hui ? – Comme d'habitude... et ça ne marche pas -Ah...* ».

Et aussi, des questions, comme ça, qui vous turlupinent quelque peu : « - *Mais qu'est ce que vous avez tous collés à vos machines ? - On attend que le spectre sorte...* »

- Sa famille, et même si on n'a pas trop l'occasion de la voir, elle n'est jamais rancunière.

- Ses stagiaires : merci à Emilie, Fatma, Alexandre et Yorann d'avoir partagé un instant de recherche ensemble. « *On n'improvise pas, on rebondit !* » ; « *C'est le temps de la manipe qui te dira quand tu pourras rentrer à la maison.* »
- Ses voisins de bureau au même niveau que vous : on partage tous le même genre de difficultés, c'est-à-dire des contraintes techniques, matérielles, avaries en tout genre... et on se serre les coudes. La patience est le maître mot, le silence aide à la contemplation (de ses résultats), et... les coups de colère font relâcher la pression, tel un autocuiseur qui se met à siffler d'un coup.
- Une secrétaire de labo (miss Alex) toujours aimable, au sourire à l'épreuve du vent et des marées.
- Enfin un visiteur du soir ; Jérôme l'Eternel.

Evoquons également son environnement musical : un peu de musique expérimentale peut être un bon stimulant pour la méditation, tout en fixant son plafond blanc...

D'une manière générale, j'ai apprécié cotoyer toutes celles et tous ceux qui n'ont jamais perdu patience, qui font preuve de sang froid en toutes circonstances et qui prônent au quotidien la tempérance. A l'avenir je devrais m'en imprégner davantage...

Générique :

Sittin' on the dock of the bay...

O. Redding

FIN

Résumé/Abstract

Deux systèmes aqueux à 20°C constitués de protéines globulaires de pois et d'alginate de sodium ont été considérés au cours de cette étude, dans des conditions de solvant fixées à pH 7,2 et 0,1 M NaCl. Dans un premier temps, le comportement de phase de globulines faiblement dénaturées (i) ou pré-agrégées thermiquement (ii) en mélange avec de l'alginate a été comparé à différentes échelles d'observation, en termes de diagrammes de phase et de microstructure analysée par microscopie confocale. Attribuée à un phénomène général d'incompatibilité thermodynamique, la séparation de phase a été décrite tout particulièrement sous des aspects morphologiques et cinétiques à l'échelle microscopique, selon la composition de départ en biopolymères et le mode de préparation des globulines. Par la suite, une gélification de chacun des deux systèmes a été opérée à froid, par libération de calcium ionique *in situ* à partir d'un sel de calcium de carbonate peu soluble au-dessus de pH 7, sous l'effet acidifiant d'une hydrolyse lente de la glucono- δ -lactone (GDL). L'intérêt d'un tel procédé reposait sur l'obtention de gels remplis à mixtes lorsque l'alginate seul ou l'alginate et la phase protéique pouvaient gélifier en présence de calcium. Des corrélations entre propriétés rhéologiques mesurées en régime dynamique (modules G' et G'') et données de microstructure ont été effectuées, par l'intermédiaire de l'analyse de texture d'image selon la méthode de cooccurrence. Chaque mélange témoignait d'une séparation de phase bloquée cinétiquement par sa gélification. Par rapport aux gels d'alginate seul ou gels remplis où l'alginate seul pouvait gélifier via le calcium, les gels mixtes témoignaient d'un effet de synergie remarquable d'un point de vue élasticité finale des gels. Dans le même temps, les globulines pré-agrégées ne montraient pas d'aptitude à la gélification selon le procédé appliqué ici. En outre, des effets ségrégatifs induisaient un enrichissement des protéines et du polysaccharide dans deux phases coexistantes, renforçant de ce fait des interactions entre biopolymères du même type. Les gels mixtes les plus élastiques présentaient une structure enchevêtrée avec un réseau protéique prédominant. Les observations en microscopie électronique à transmission effectuées par un marquage différentiel des deux biopolymères suggèreraient qu'il puisse se former localement des interactions attractives inter-biopolymères, probablement via le calcium, à l'interface des deux phases initialement immiscibles. Ce pontage consoliderait globalement la cohésion entre les deux réseaux protéique et polysaccharidique.

Mot-clés : protéines globulaires de pois, alginate, séparation de phase, incompatibilité, agrégation, réseau, gélification, rhéologie, microstructure.

Two aqueous systems at 20°C in 0.1 M NaCl and pH 7.2 containing globular pea proteins and sodium alginate were investigated in this study. First, phase behavior of (i) either low-denatured mixed globulins or (ii) their thermally pre-aggregated counterparts - alginate mixtures was compared using a multi-scale approach, by means of phase diagram and microstructure analysis by confocal microscopy. Thermodynamic incompatibility was the main driving force leading to phase separation within the mixtures, which presented according to their initial biopolymer composition both different morphological and time-evolution features of coexisting phases. Thereafter, a cold-set gelation for each system was performed, as the slow hydrolysis of glucono- δ -lactone (GDL) acidified the media and mediated the release *in situ* of calcium ions from calcium carbonate, practically insoluble at pH higher than 7. Such procedure would allow gelation via calcium of alginate only or both alginate and the protein phase, giving rise to filled and mixed gels, respectively. An attempt to correlate rheological measurements (G' , G'' dynamic moduli) with microstructural data was carried out according to image texture analysis by the cooccurrence method. Phase separation was kinetically entrapped by gelation. Compared to single-alginate gels or native globulins-alginate filled gels where alginate was the only gelling agent via calcium, mixed gels reflected in fact great synergism effect regarding final gel elasticity. Meanwhile, pre-aggregated pea globulins could not form a gel with the gelation procedure of choice here. Besides, stronger segregative effects were evidenced by increasing initial biopolymer composition thus enhancing self-biopolymer interaction in their respective enriched-coexisting phases. The strongest mixed gels displayed entangled structure. According to a differential labelling of each incompatible biopolymer, observations with transmission electron microscopy suggested inter-biopolymer attractive interaction at the interface of coexisting phases, probably via calcium cations. Salt-bridging would reinforce cohesiveness between both protein and alginate networks.

Keywords: globular pea proteins, alginate, phase separation, incompatibility, aggregation, network, gelation, rheology, microstructure.

