

Thèse de doctorat

LE MANS UNIVERSITE
Comue Université Bretagne Loire

ECOLE DOCTORALE N° 596

Matière Molécules et Matériaux

Spécialité : « *CHIMIE PHYSIQUE, CHIMIE THÉORIQUE* »

Par

« **Walailuk INTHAVONG** »

« Elaboration et caractérisation de nanoparticules de protéines »

Thèse présentée et soutenue à « Université du Maine », le « 18 juillet 2018 »

Unité de recherche : LUNAM, Université du Maine, Institut des molécules et matériaux du Mans UMR
CNRS 6283, avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans Cedex France

Rapporteurs avant soutenance :

Professeur Rémi SAUREL, AgroSup Dijon Equipe PAV
(Physico-Chimie des aliments et du Vin) UMR PAM 1,
esplanade Erasme, F-21000 Dijon

Docteur Laurence Ramos, Laboratoire Charles Coulomb
UMR 5221 CNRS-UM Université de Montpellier Place
Eugène Bataillon - CC026 F-34095 Montpellier Cedex 5

Composition du Jury :

Professeur Rémi SAUREL, AgroSup Dijon Equipe PAV
(Physico-Chimie des aliments et du Vin) UMR PAM 1,
esplanade Erasme, F-21000 Dijon

Docteur Laurence Ramos, Laboratoire Charles Coulomb
UMR 5221 CNRS-UM
Université de Montpellier Place Eugène Bataillon - CC026
F-34095 Montpellier Cedex 5

Professeur Christophe Chassenieux, IMMM UMR CNRS
6283 - Equipe PCI

Directeur de thèse

Docteur Taco Nicolai, IMMM UMR CNRS 6283 - Equipe
PCI

Co-directeur de thèse

Hommes, soyez humains, c'est votre premier devoir ; soyez-le pour tous les états, pour tous les âges, pour tout ce qui n'est pas étranger à l'homme. Quelle sagesse y a-t-il pour vous hors l'humanité ?

Jean-Jacques Rousseau ; Émile, ou De l'éducation (1762)

La maladie a du moins un avantage, elle nous fait connaître nos amis.

Anatole France ; Filles et garçons (1915)

Remerciement

Je tiens à remercier le Professeur Christophe Chassenieux et le docteur Taco Nicolai pour leurs conseils, leur aide lors de ces trois années de thèse. Je vous remercie vos présences quand j'ai besoin des conseils pour avancer ma thèse.

Je tiens également à remercier les membres du jury : Professeur Rémi SAUREL et Docteur Laurence Ramos, d'avoir aimablement accepté de juger mon travail.

Je voudrais aussi remercier les équipes de PCI, tous les permanents et les (anciens) thésards pour leur aide et conseils pendant mes trois années de thèse.

Mes remerciements vont aussi au gouvernement thaïlandais, l'ambassade de la Thaïlande et Ministry of Science and Technology qui ont financé cette thèse. Je vous remercie tous pour votre humanité, votre professionnalisme et votre aide financière qui m'a permis de finir ma thèse.

Je remercie certains collègues qui sont devenu amis pour leur soutien et leur conseil.

I would like to thank you some colleague who become my friend, ကျေးဇူးပြု၍ for your help and encouragement.

Je remercie mon compagnon qui est à côté de moi et qui me comprend dans toutes les circonstances de la vie.

Je remercie mes deux familles (surtout mes deux mamans) pour leur amour pur sans condition, leur temps passé pour prendre soin de moi. Je suis loin de vous mais mon amour est toujours proche de vous « Votre petite Walailuk »

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่รักและให้กำลังใจข้าพเจ้ามาตลอด ขอขอบคุณทุกความห่วงใยและความหวังดีที่มีให้ ขอขอบคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ดูแลอบรมสั่งสอนลูก ขอขอบคุณที่รักลูกแบบไม่มีเงื่อนไข ลูกจะขอยึดมั่นคำสอนของท่านตลอดชีวิตของลูก

ด้วยความรักและเคารพอย่างหาที่สุดไม่ได้

Sommaire

Sommaire

Introduction générale	11
Chapitre I Bibliographie	15
I.1 Les protéines du lait	16
I.1.1 Isolat de protéine sérique (Whey Protein Isolate).....	16
I.1.2 Agrégats de protéines sériques.....	18
I.2 Les protéines de soja	20
I.2.1 Des agrégats de soja.....	22
I.3 Suspension dense	24
I.4 Diffusion	27
I.4.1 Diffusion dans un milieu dilué.....	28
I.4.2 Diffusion dans un milieu concentré et dans gel	28
I.4.3 Méthode détermination du coefficient de diffusion.....	29
I.4.4 Auto diffusion du traceur dans une suspension dense protéique et dans un gel.	29
Chapitre II. Matériaux et Méthodes	37
II.1 Matériaux	38
II.1.1 Béta-lactoglobuline (β -lg).....	38
II.1.2 Protéine de lactosérum (WPI).....	38
II.1.3. Protéine de soja (SPI)	39
II.1.4 FITC-dextran	41
II.2 Méthodes	42
II.2.1.Centrifugation	42
II.2.2.UV-Visible.....	42
II.2.3.Chromatographie d'exclusion stérique.....	42
II.2.4.Réfractométrie différentielle.....	43
II.2.5.Titrage potentiométrique	44
II.2.6.Ultrafiltration	45
II.2.7.Diffusion de la lumière	48
II.2.7.1. Diffusion statique de la lumière.....	49
II.2.7.2. diffusion de la lumière dynamique	52
II.2.8.Rhéologie.....	53

II.2.9. Microscopie confocale.....	55
II.2.9.1. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).....	57
Chapitre III : Résultats et discussions.....	62
III.1 Agrégats de protéines sériques	63
III.1.1 Structure des agrégats et des gels fractals à la concentration de préparation.....	63
III.1.2 Structure des agrégats fractals en milieu dilué.....	66
III.1.3 Structure et Viscosité de microgels de WPI.....	73
III.2 Structure et viscosité d'agrégats d'isolats de protéines de soja (SPI).....	74
III.3 Mélange d'agrégats fractal de différentes tailles	79
III.4 Mélange d'agrégats fractal et de microgels de WPI.....	82
III.5 Mélange d'agrégats fractals de WPI et de SPI	84
III.6 Mobilité de traceurs polymères dans les suspensions denses d'agrégats et dans les gels de protéines sériques.....	86
III.6.1 Influence de la taille et de la structure des agrégats.....	88
III.6.2 Influence de la taille du traceur	90
Conclusion.....	90
Conclusions générales et perspectives	94
Annexe.....	98
Article 1: Structure and Flow of Dense Suspensions of Protein Fractal Aggregates in Comparison with Microgels.	102
Article 2: The Effect of Aggregation into Fractals or Microgels on the Charge Density and the Isoionic Point of Globular Proteins.	123
Article 3: Polymer diffusion in globular protein gels and aggregate suspensions.	134

Introduction générale

Introduction générale

Les protéines globulaires (WPI) et les protéines de soja (SPI) peuvent être considérées comme des nanoparticules denses stabilisées en solution aqueuse par des répulsions électrostatiques. Le chauffage de ces protéines natives peut provoquer leur agrégation irréversible. Des agrégats de différentes tailles et masses molaires sont obtenus par chauffage de solutions à différentes concentrations en protéine. Eventuellement un réseau peut être obtenu au-dessus d'une concentration de gélification critique (C_g). La taille des agrégats augmente avec l'augmentation de la concentration en protéines et diverge à C_g . La structure locale des agrégats et la valeur de C_g dépendent du type de protéine, du pH et du sel ajouté.

L'objectif de cette thèse est d'étudier les propriétés des suspensions denses de protéines globulaires de lait et de protéines de soja à l'état natif ou dénaturé. L'élaboration et la formulation d'agrégats de protéines de lait et de protéines végétales de différentes morphologies ont été examinées et leur fonctionnalité en termes de propriétés mécaniques et de structure a été mesurée par rhéologie et diffusion de la lumière. L'effet important de la taille et de la forme des agrégats de protéines sur la viscosité a été établi par l'étude de la mobilité de molécules « sondes » dans ces milieux en utilisant la microscopie confocale à l'aide de la technique du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP).

Ce manuscrit se compose de 3 chapitres avec une conclusion générale et des perspectives et en annexe le manuscrit des 3 articles qui découlent de ce travail.

Le Chapitre 1 est une étude bibliographique qui rappelle la structure des agrégats de protéines sériques et celle des agrégats de protéines de soja en précisant leur mécanisme d'agrégation par dénaturation thermique et l'influence de différents paramètres sur leur structure. Ce chapitre décrit également des études de la mobilité de chaînes polymères utilisées comme sondes/traceurs dans des gels.

Le Chapitre 2 décrit les compositions des protéines ainsi que les principales techniques et protocoles expérimentaux utilisés au cours de ce travail.

Le Chapitre 3 présente les principaux résultats obtenus. Des agrégats de WPI de taille et structure variables (microgels et fractals) ont été obtenus par chauffage à différentes

concentrations de solutions de WPI. Ces agrégats ont été caractérisés en solution diluée pour mesurer leur masse molaire et leur taille et à des concentrations plus importantes pour mesurer leur compressibilité osmotique. La taille des agrégats a été variée en jouant sur la concentration initiale de préparation. De la même manière des agrégats de protéines de soja ont été formés. Ensuite différents mélanges ont été formulés : agrégats fractals de différentes taille, agrégats fractals et microgels de taille identique, agrégats de WPI et SPI. La structure et les propriétés rhéologiques des mélanges ont été mesurées. Enfin, nous avons étudié la mobilité de chaînes de dextran fluorescentes dans les suspensions (diluées à concentrées) et dans les gels de WPI.

Annexe

Article 1 : Il présente l'étude de la structure et de l'écoulement de suspensions denses d'agrégats fractals de protéines de lait en comparaison avec les propriétés de microgels.

Article 2 : Il décrit comment le point isoionique du WPI mesuré par titration est influencé par son agrégation suite à une dénaturation thermique

Article 3 : Il présente la mesure du coefficient de diffusion de sonde fluorescente dans des suspensions denses et dans des gels de WPI.

Chapitre I : Bibliographie

I.1 Les protéines du lactosérum

Le lait est une source importante de nutriments pour la population mondiale en raison de sa teneur en protéines. La plupart du lait n'est pas consommée directement mais consommée sous forme de produits laitiers tels que les yaourts, le fromage, le beurre et le lait en poudre. En France, la majorité des produits laitiers est consommée sous forme de fromages et de yaourts. Le lait est macroscopiquement un liquide opaque blanc dont la viscosité est environ 1.5 fois plus élevée que celle de l'eau (Fox et al 1989, Cayot et al 1998). Le lait contient 3,2 à 3,5 % en poids de protéines dont 80 % de caséine et 20 % de protéines de lactosérum.

I.1.1 Isolat de protéine sérique (Whey Protein Isolate)

L'isolat de protéines sériques (WPI) a une densité bien définie et une structure principalement rigide qui détermine sa fonction dans les organismes vivants. Les solutions de protéines globulaires sont généralement présentes sous la forme de monomères et de petits oligomères qui sont stabilisées par des répulsions électrostatiques.

La charge nette des protéines globulaires dépend du pH et est nulle au point iso-ionique c'est-à-dire que les protéines contiennent autant de charges négatives que positives. Le WPI présente une faible concentration dans le lactosérum, c'est pourquoi on a recours à des techniques membranaires permettant la production de concentrés des WPI avec des teneurs en protéine d'au moins 90 %. Le WPI contient 60 % de β -lactoglobuline (β -lg), 20 % de α -lactalbumine (α -lac) et d'autres protéines telle que l'albumine de sérum bovin (BSA) (Hambling et al 1992).

La β -lactoglobuline contient deux ponts disulfures et un thiol libre et présente deux variants génétiques A et B qui se retrouvent dans des quantités approximativement égales. La plupart des études de recherche et développement des molécules de protéines a été accomplie sur les mélanges naturels des deux variants. Les études des variants purs ont montré des différences de taux d'agrégation après la dénaturation thermique (Lebon et al 2002, Croguennec et al 2004). La β -lg est la principale protéine qui s'agrège en créant des interactions avec d'autres

protéines, des liaisons se forment entre les protéines conduisant à l'agrégation. Ce qui n'est pas le cas pour l' α -lac qui contient quatre liaisons disulfures mais aucun groupe thiol libre.

La β -lactoglobuline possède quatre niveaux de structure différents. La structure primaire comporte 162 acides aminés reliés par liaison peptidique ce qui conduit à une masse molaire de $1,8 \times 10^4$ g/mol (Nicolai et al 2011). La structure primaire présente des structures locales bien ordonnées de type hélices α ou feuillets β reliées par des liaisons hydrogène intramoléculaires. La structure tertiaire correspond à l'organisation tridimensionnelle de la protéine stabilisée par la formation de ponts disulfures et par plusieurs types d'interactions suivantes :

- Des liaisons covalentes maintiennent les deux atomes de soufre (ponts disulfures) de la chaîne latérale de 2 résidus dans une chaîne peptidique. La force de cette liaison est de 251 kJ/mol, sa position peut impliquer une restriction géométrique et augmenter la stabilité de la structure.
- Les liaisons hydrogène sont des liaisons faibles avec des énergies d'environ 10 à 40 kJ/mol et ont une longueur d'environ 0,18 nm (Bryant et al 1998).
- La liaison hydrogène est l'interaction la plus importante pour maintenir les structures secondaires et tertiaires.
- Les interactions électrostatiques agissent entre les chaînes latérales chargées d'acides aminés. Elles peuvent être soit répulsives lorsque les groupes chimiques ont le même signe soit attractives quand leurs signes sont différents. Au-dessus du point d'isoionique (pI) qui est d'environ 5,2 pour le WPI, les protéines sont chargées négativement, alors qu'à pH plus bas la charge nette est positive. Au pI, la charge nette est nulle mais la protéine contient toujours des charges positives et négatives (Bryant et al 1998). L'interaction électrostatique peut être réduite par l'ajout d'électrolytes. Les interactions électrostatiques jouent un rôle très important dans les interactions intermoléculaires des protéines mais elles participent relativement peu à la stabilisation de la conformation des protéines.

- Les interactions de Van der Waals sont liées à la polarisation des atomes de protéines. Il s'agit d'une interaction faible d'environ 1 à 3 kJ/mol mais elle peut jouer un rôle important dans la stabilisation de la conformation en raison du grand nombre d'entre elles (Kinsella et Whitehead 1989).
- Les interactions hydrophobes sont des liaisons entre les groupes apolaires des polypeptides. Lorsqu'un groupe apolaire est en contact avec l'eau, il entraîne une perturbation des liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau. Ces changements ne sont pas thermodynamiquement favorables et le système tend à réduire la zone de contact entre l'eau et les groupes apolaires.

Le chauffage ou la mise sous pression peut provoquer un changement de structure et rendre la chaîne peptidique plus mobile. En conséquence, des segments de différentes protéines peuvent interagir par des interactions hydrophobes ou par la formation de liaisons hydrogènes qui entraînent une agrégation de la protéine.

I.1.2 Agrégats de protéines sériques

La répulsion électrostatique à longue distance rend les solutions de β -lg natives stables à température ambiante sauf quand la charge nette est proche du point isoélectrique ($pI = 5.2$). L'élévation de la température ou une pression élevée peuvent être à l'origine de la dénaturation des protéines. Ceci entraîne un changement de conformation et la modification des propriétés physico-chimiques des protéines par rapport à leur état natif (Hollar et al 1995). L'agrégation des protéines provoquée par la chaleur ou la pression se trouve être irréversible, les agrégats formés sont stables à la température ambiante. Leur taille et structure dépendent de la concentration en protéine (C), du protocole de chauffage, du type et de la concentration en sel ajouté et du pH (Jung et al 2008). Proche du pI, les protéines contiennent autant de charges positives que négatives, des interactions entre des charges de signes opposés peuvent être impliquées dans l'agrégation en plus des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène. Le taux d'agrégation est très lent à une température proche de l'ambiante et à

faible concentration de la protéine mais il augmente avec la température ou par ajout du sel ce qui peut conduire à la gélification voire à la précipitation à concentration élevée en protéine (Majhi et al 2006, Mehalebi et al 2008).

L'agrégation de la β -lg native est favorisée lorsque le pH est loin du pI. Le taux d'agrégation est maximal à environ pH 4,6 et est négligeable à pH 5,5.

A pH neutre et à température ambiante, la β -lg native présente un équilibre monomères / dimères. Lors de l'augmentation de la température l'équilibre est déplacé vers le monomère, la densité de charge augmente (Aymard et al 1996, Renard). Quand la β -lg est chauffée au-dessus de 60 °C, la structure secondaire est partiellement modifiée (Croguennec et al 2004). La chaîne protéique devient plus mobile dans cet état mais ne se déploie pas complètement, des chaînes sont reliées entre elles en conduisant à l'agrégation (voir la figure 1).

L'agrégation par auto-association des protéines sériques peut s'expliquer en deux étapes. La première est la formation de petits agrégats rigides ou semi-flexibles, les 'strands'. La seconde agrégation est celle de ces petits agrégats pour former des agrégats fractals de dimension 2, des gels polydisperses ou bien des précipités (Nicolai et al 2013). La taille des agrégats augmente avec le temps de chauffage jusqu'à l'obtention d'un état stable (Le Bon et al 1999).

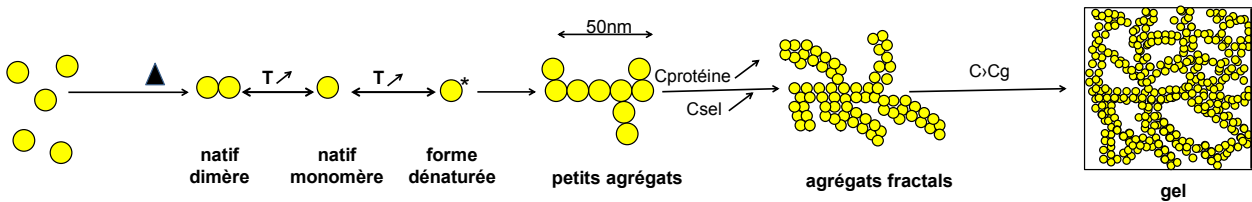


Figure 1 Modèle d'agrégation avec la formation de petits agrégats qui forment des agrégats fractals de plus grande taille en s'associant. Il y a formation d'un gel par chauffage à une concentration en protéine $C > C_g$ (Aymard et al 1995).

La masse molaire (M_w) et le rayon hydrodynamique (R_h) des agrégats augmentent avec l'augmentation de la concentration de la protéine chauffée et diverge à la concentration de gélification (C_g). Un gel transparent est observé par chauffage des protéines à une concentration supérieure à C_g en absence du sel, la transparence du gel s'explique car le

système est homogène à une échelle d'observation supérieure à quelques dizaines de nanomètres (Mahmoudi et al. 2007).

Des microgels sont formés quand la solution native est chauffée dans des conditions telles que la densité de charge du système est inférieure à la valeur critique (en diminuant le pH de la solution) ou en présence du sel. Pendant l'agrégation, les particules s'associent d'abord en petits agrégats qui s'auto-associent entre eux pour former des microgels (des particules sphériques denses) ou des gels (des particules sphériques denses) ou des gels (Schmitt et al 2009, Phan-Xuan et al 2011, Nicolai 2015).

La figure 2 montre des images de microscopie électronique à transmission (TEM) de microgels formés par la dénaturation thermique à pH 2 (la figure 2A), d'agrégats formés à pH 5,8 (la figure 2B) ou à pH 7 (la figure 2C).

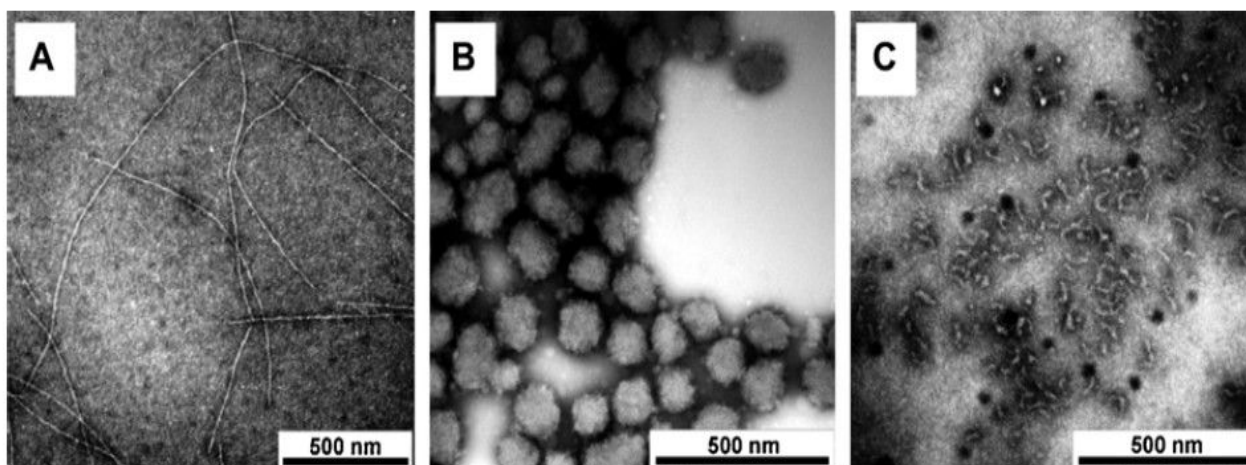


Figure 2 Images de TEM d'agrégats formés pendant le chauffage de 10 g/L de β -lg en phase aqueuse à pH 2,0 (A), pH 5,8 (B) et pH 7,0 (C) (Jung et al 2008).

I.2 Les protéines de soja

Le soja est actuellement la source de protéine végétale la plus importante dans les aliments. Les principaux composants protéiques sont la β -conglycinine (globuline 7S) et la glycinine (globuline 11S). Le soja contient environ 35-40 % de protéines et environ 20 % d'huile. L'isolat de protéines de soja (SPI) est obtenu par élimination de l'huile à basse température et par acidification à pH 4.5.

La β -conglycinine et la glycinine ont une masse molaire respectivement de 2×10^5 g/mol et $3,6 \times 10^5$ g/mol. Les protéines de soja isolées et purifiées (SPI) présentent des propriétés fonctionnelles intéressantes, comme des propriétés gélifiantes, tensioactives et émulsifiantes. La solubilité du SPI dépend fortement du pH, du traitement thermique, de la présence et de la concentration en sels ou d'autres ingrédients (Xin Gu et al 2009, Brooks et al 1985, Chen et al 2016).

Les structures de la β -conglycinine et de la glycinine ont été déterminées par diffraction des rayons X (Maruyama et al 2001). La globuline 11S est sous forme d'hexamère et se compose de cinq différentes sous-unités dont chacune est constituée d'une sous-unité acide A et une sous-unité basique B liées par une liaison disulfure.

On suppose que les sous-unités AB s'associent par des liaisons électrostatiques et hydrogène comme représenté sur figure 3. La glycinine native a une structure compacte et stabilisée par des liaisons disulfures ce qui entraîne une capacité émulsifiante et moussante inférieure à celle de la β -conglycinine qui n'a pas de liaison disulfure (Badley et al, 1975).

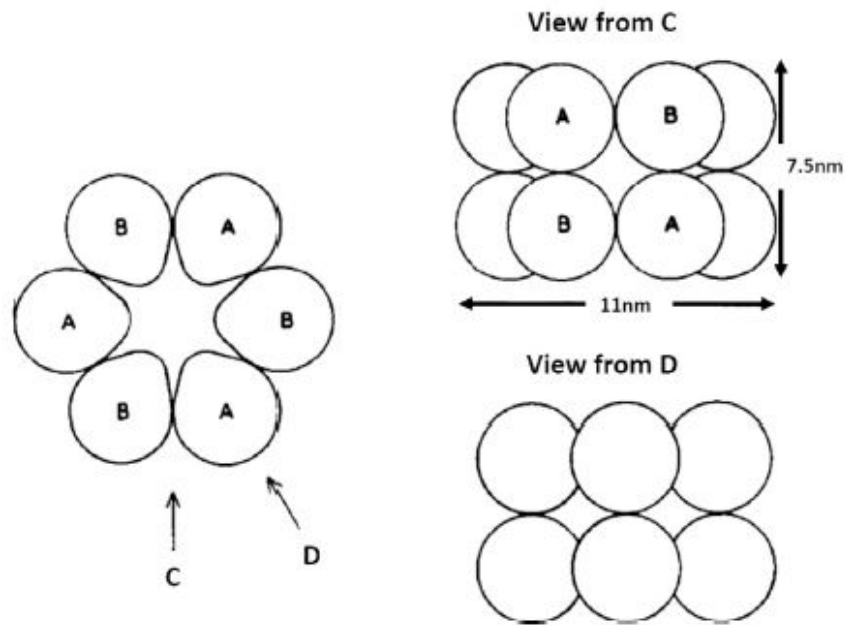


Figure 3 Structure de la glycinine représentant les sous unités acide A et basique B (Badley et al, 1975).

I.2.1 Des agrégats des protéines de soja.

Lorsque la solution SPI est chauffée les protéines sont dénaturées ce qui conduit à une agrégation irréversible des protéines. À pH neutre la température de dénaturation a été déterminée par DSC est environ 65 °C et 80 °C pour la β -conglycinine et la glycinine respectivement, la température de dénaturation diminue avec une augmentation du pH et elle augmente avec la force ionique (Guo et al 2012).

Au cours de la dénaturation thermique du SPI, des sous-unités monomères de protéines 7S et 11S sont dissociées. Les agrégats sont principalement composés de polypeptides basiques et acides à base de 11S, en plus d'une très petite quantité de sous-unités A du 7S. Cette dénaturation thermique du SPI peut conduire à la formation de co-agrégats stables, de gels ou de précipités en fonction de la concentration en protéine, du temps de chauffage, de la température et du pH.

Pour comprendre mieux les co-agrégats formés par chauffage de solutions de SPI à pH 7, les études de la dénaturation de la β -conglycinine et de la glycinine pures ont été développées. En mélange, il y a possibilité d'interactions entre la β -conglycinine et la glycinine. Les groupes hydrophiles apportés par la β -conglycinine couvrent la surface des agrégats de glycinine.

La figure 4 montre des images Cryo-TEM d'agrégats formés par chauffage des solutions SPI à pH 6,0 à $C = 5$ g/L et $C = 20$ g/L. A $C = 5$ g/L les particules sont irrégulière avec une distribution de taille plutôt étroite avec $R_h = 35$ nm. A $C = 20$ g/L les images montrent des petits d'agrégats qui s'associent aléatoirement en conduisant à une structure auto-similaire qui est mesurée par diffusion de la lumière.

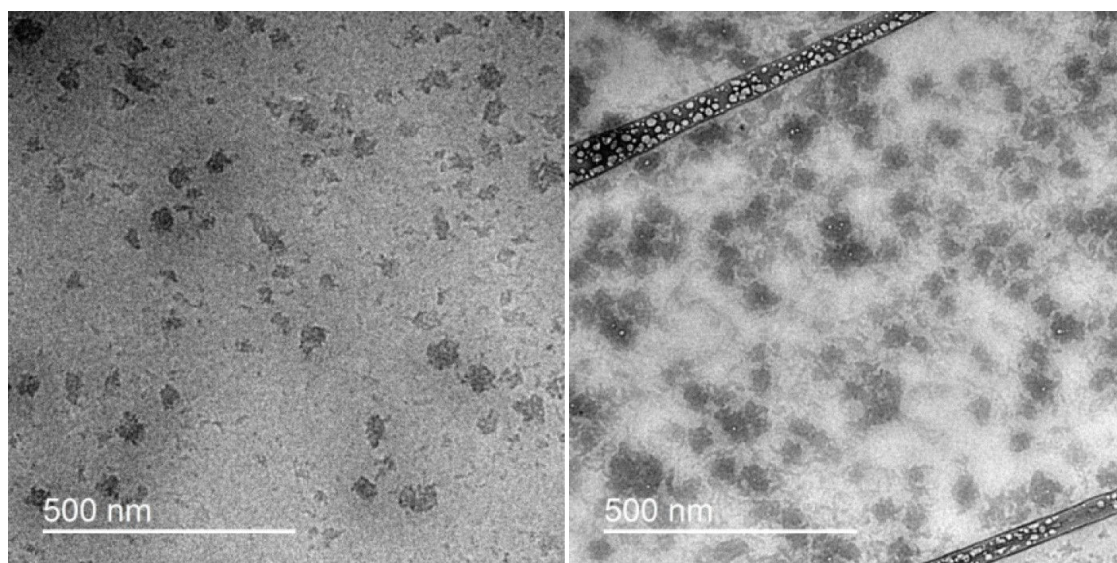


Figure 4 images Cryo-TEM des agrégats SPI formés après le chauffage de solutions SPI à pH 6,0 à 95 °C pendant 30 min à $C = 5$ g/L (gauche) ou $C = 20$ g/L (droite) (Chen et al 2017).

I.3 Suspension dense

Les protéines du lait et végétales à l'état natif ou agrégées peuvent être considérées comme des colloïdes plus ou moins stables en suspension. Les mots dispersion et suspension ont souvent été utilisés pour décrire des systèmes biphasiques c'est-à-dire une phase solide qui est dispersée dans un fluide continu (un liquide). Dans une phase dispersée, les particules sont séparées les unes des autres en raison de l'action de forces de cisaillement, ou de forces répulsives alors que dans le cas où des forces attractives dominent, les particules ont tendance à être agrégées au lieu de se disperser (Genovese 2012).

Il existe plusieurs types de particules colloïdales comme le montre la figure 5 dont la structure et l'élasticité peuvent être variées à façon.

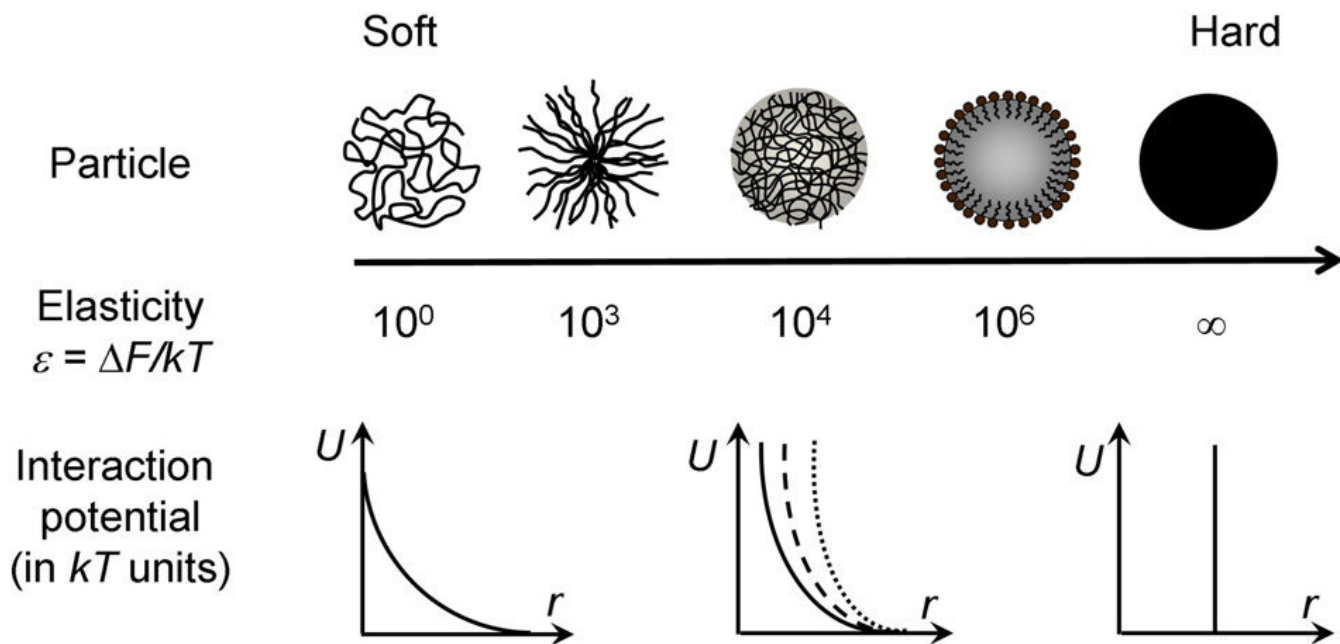


Figure 5 Différents types de particules colloïdales (Vlassopoulos et al 2014).

Pour les différents types de particules, la viscosité des suspensions augmente avec la fraction volumique. Toutefois, les propriétés rhéologiques et les transitions liquide-solide (transition vitreuse ou cristallisation) dans des systèmes colloïdaux mous peuvent être contrôlées en modifiant les paramètres chimiques et physiques des colloïdes (pH, température, qualité du

solvant, addition de petits polymères non adsorbés). Les effets d'interactions attractives entre colloïdes ont été étudiés. Lorsqu'elles sont faibles, elles provoquent une augmentation de la mobilité des particules mais quand l'interaction attractive devient forte cette mobilité est réduite dans le système.

La compressibilité osmotique de colloïdes sphériques diminue fortement avec la fraction volumique (ϕ) (Genovese 2012). La viscosité est d'abord contrôlée par la phase continue liquide qui peut être newtonienne ou pas. L'effet de la taille des particules est très important lorsque la dispersion est au repos parce que les particules sont dispersées au hasard au sein de la phase continue. Si le système est cisailé avec des taux de cisaillement très bas, il doit y avoir beaucoup de mouvements coopératifs pour permettre aux particules de se déplacer dans la direction de l'écoulement tout en conservant aléatoire l'ensemble de la distribution. Cela conduit à une viscosité élevée (Tsenoglou 1989, Genovese 2012).

Cependant si le système est cisailé à un taux de cisaillement plus élevé, les particules peuvent être déplacées ce qui conduit à une situation où il commence à se former des chapelets de particules et des couches (voir la figure 6).

La distance moyenne entre les particules augmente dans la direction perpendiculaire à la direction d'écoulement et diminue selon la direction de l'écoulement

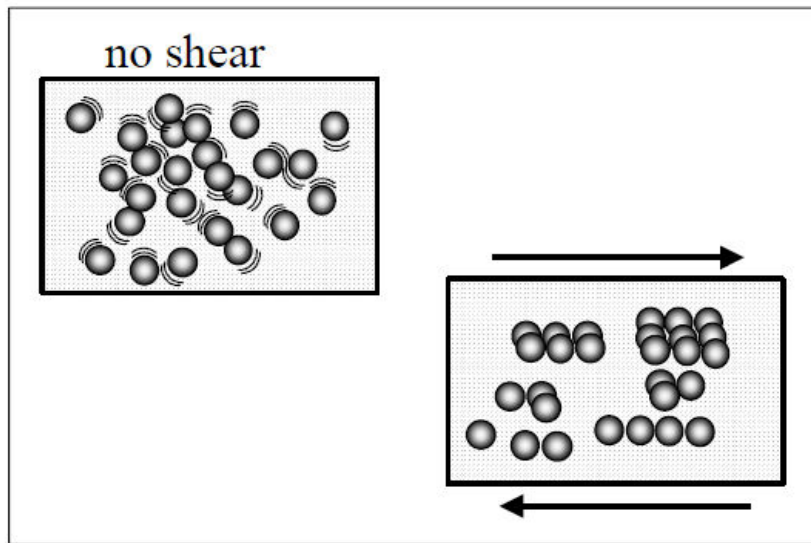


Figure 6 Formation de chapelets et de couches de particules pour une suspension de sphères browniennes sans interaction sous l'action d'un cisaillement (Barnes 2000).

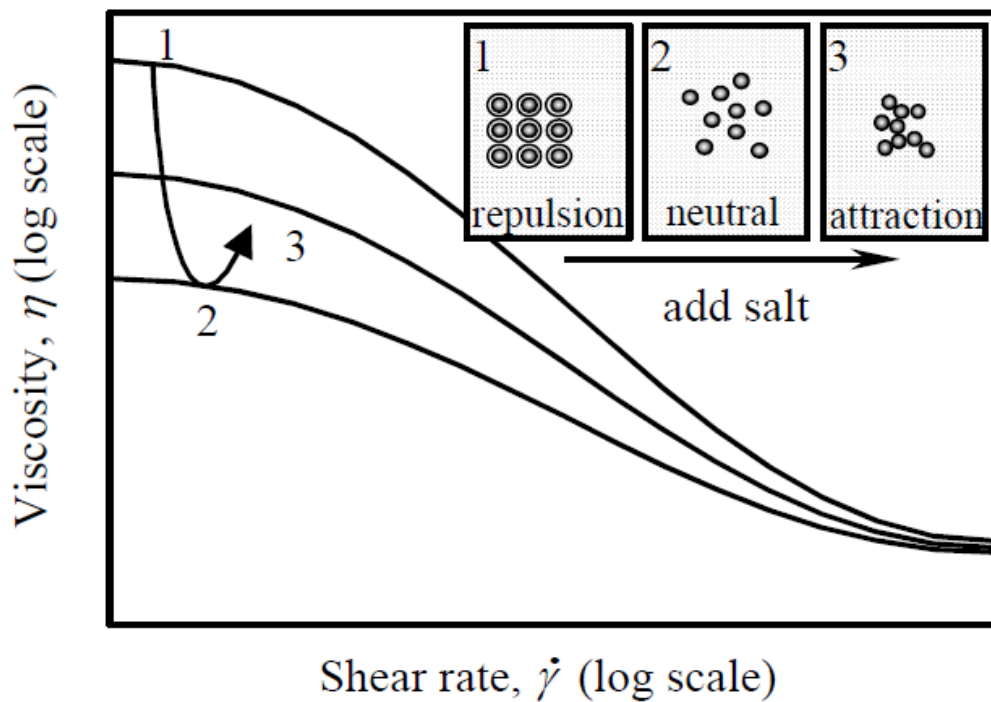


Figure 7 Courbe d'écoulements de suspensions de particules chargées avec différents ajouts de sel (Barnes 2000).

On peut moduler la force globale et la nature des interactions entre particules, par exemple en ajoutant un électrolyte dans une suspension de sphères chargées. La charge à la surface de ces

particules induit une grande répulsion qui les conduit à former un état pseudo-cristallin. Dans cet état, il est difficile pour les particules de se connecter dans le flux de cisaillement donc la viscosité est élevée dans ce cas.

Si un électrolyte est ajouté dans la solution, les charges à la surface des particules sont écrantées et la répulsion entre les particules est réduite. Ce qui signifie une diminution de la viscosité. Il pourrait également y avoir une petite diminution de viscosité aux taux de cisaillement élevé si le sel est suffisamment ajouté, les particules sont finalement « neutres » les unes par rapport aux autres.

Dans le cas où le sel est ajouté en excès, la répulsion électrostatique devient négligeable, la force attractive de Van-der-Waals domine donc les particules flocculent. La viscosité augmente à nouveau, comme indiqué dans la figure 7 (Garcia-Salinas et al 1998, Barnes 2000).

I.4 Diffusion

La diffusion est le processus responsable du mouvement spontané d'une région de concentration supérieure vers une région de plus faible concentration en raison de mouvements moléculaires aléatoires (dits browniens). Le processus de diffusion est beaucoup plus rapide dans des gaz que dans des liquides et des solides (Masaro et al 1999).

Pour des polymères, le coefficient de diffusion dépend de la concentration, de leur masse molaire, de la qualité du solvant et d'autres variables. La résonance magnétique nucléaire à gradient de champ pulsé (PFG-RMN) et la microscopie confocale peuvent être utilisées pour déterminer le coefficient d'autodiffusion (D_s) des polymères et des colloïdes en solution. La diffusion dynamique de la lumière (DLS) peut être utilisée pour déterminer le coefficient de diffusion coopératif (D_c).

Le coefficient d'autodiffusion (D_s) qui caractérise l'écoulement entre les particules et le solvant peut être déterminé à l'aide de l'équation ci-dessous :

$$D_s = \frac{R.T.M}{f_{ps} + f_{pp}} \quad \text{Eq (1).}$$

Avec f_{ps} le coefficient de frottement particule-solvant, f_{pp} le coefficient de frottement particule-particule, M la masse molaire des particules, R la constante du gaz parfait et T la température absolue.

D_c dépend uniquement du coefficient de frottement du couple particule-solvant car il caractérise l'écoulement du solvant au-delà des particules. D_c dépend aussi de la compressibilité osmotique ($d\pi/dC$) qui peut être déterminée indépendamment en utilisant la diffusion de lumière statique (SLS) (Le Bon et al 1999).

$$D_c = \frac{(1-\varphi)^2}{f_{ps}} \left(\frac{d\pi}{dC} \right) \quad \text{Eq(2).}$$

Avec C qui est la concentration en poids par volume et φ la fraction volumique du soluté.

I.4.1 Diffusion dans un milieu dilué

Le coefficient d'auto diffusion de particules sphériques diluées dans un liquide est lié à la viscosité du solvant (η) et au rayon hydrodynamique (R_h) de la particule via la Relation de Stokes-Einstein

$$D_s = \left(\frac{k.T}{6\pi\eta R_h} \right) \quad \text{Eq (3).}$$

Avec f le coefficient de frottement du soluté, k la constante de Boltzman.

Cette relation est valable à condition que la taille du soluté soit beaucoup plus grande que celle du solvant.

I.4.2 Diffusion dans un milieu concentré et dans gel

Dans des solutions non diluées, des interactions entre les particules sont observées donc un rayon hydrodynamique apparent est mesuré. Dans les gels, une partie des fluctuations de concentration est gelée ce qui rend les systèmes non ergodiques.

La diffusion dans les solutions à haute concentration et dans les gels est complexe, il est difficile de mesurer la diffusion des molécules dans ces systèmes. Il existe différentes théories pour expliquer la diffusion de traceurs qui décrivent des effets d'obstruction et l'interaction hydrodynamique.

Dans les modèles d'obstruction, on suppose que le coefficient d'autodiffusion des gels est beaucoup plus lent que celui du traceur parce que, dans le gel, le polymère est considéré comme immobile et immergé dans une solution. (Mackie et al 1955).

Les théories hydrodynamiques considèrent l'interaction hydrodynamique dans l'ensemble du système. Ceci inclut les interactions de frottement entre le soluté et le polymère, le soluté et le solvant et le solvant et le polymère. Toutes ces interactions jouent un rôle important pour la diffusion dans des solutions de polymères plus concentrées où les chaînes polymères commencent à s'enchevêtrer (George et al 1987).

La mobilité des chaînes polymères flexibles dans les suspensions denses d'agrégats protéiques dépendra à la fois de la taille et de la morphologie de ces agrégats. Elle peut être déterminée par la mesure du coefficient de diffusion du traceur dans ces milieux à l'aide de la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP).

I.4.3 Méthode de détermination du coefficient de diffusion

La FRAP est utilisé dans ce travail pour étudier la diffusion d'un polymère marqué à travers une matrice polymère qui est soit une solution de protéines natives, soit une dispersion d'agrégats fractals ou de microgels (purs ou en mélange), soit des gels. Le coefficient de diffusion mesuré devrait être appelé coefficient d'autodiffusion du traceur (Lorén et al 2009, Deschout et al 2010)

I.4.4 Auto diffusion du traceur dans une suspension dense et dans un gel.

L'autodiffusion des traceurs moléculaires a été largement étudiée dans les systèmes protéiques comme la caséine et les gels de β -lactoglobuline en utilisant la RMN à gradient de champ pulsé. L'effet de l'autodiffusion de traceurs de différentes masses molaires dans les solutions à différentes concentrations en protéines et dans des gels a été étudié (Colsenet et al 2006).

Par exemple un polysaccharide (dextran) a été ajouté dans une solution de β -lg native sans perturber l'agrégation et la gélification des systèmes lors de la dénaturation thermique. La RMN à gradient de champ pulsé a été utilisée pour déterminer le coefficient d'autodiffusion (D_s) des protéines et du dextran en fonction du temps de chauffage. La figure 8 montre l'évolution de D_s en fonction du temps de chauffage de solutions de β -lg à 179 g/L chauffées à 70 °C et à 76 °C. D_s augmente avec le temps de chauffage et se stabilise à une valeur plus grande.

Après un certain temps de chauffage des agrégats β -lg sont formés dont la friction vis à vis du dextran augmente. Au point de gel, une structure protéique « immobile » qui varie très peu avec le temps de chauffage est formée. Ainsi, le coefficient de diffusion reste constant (Croguennoc et al 2001).

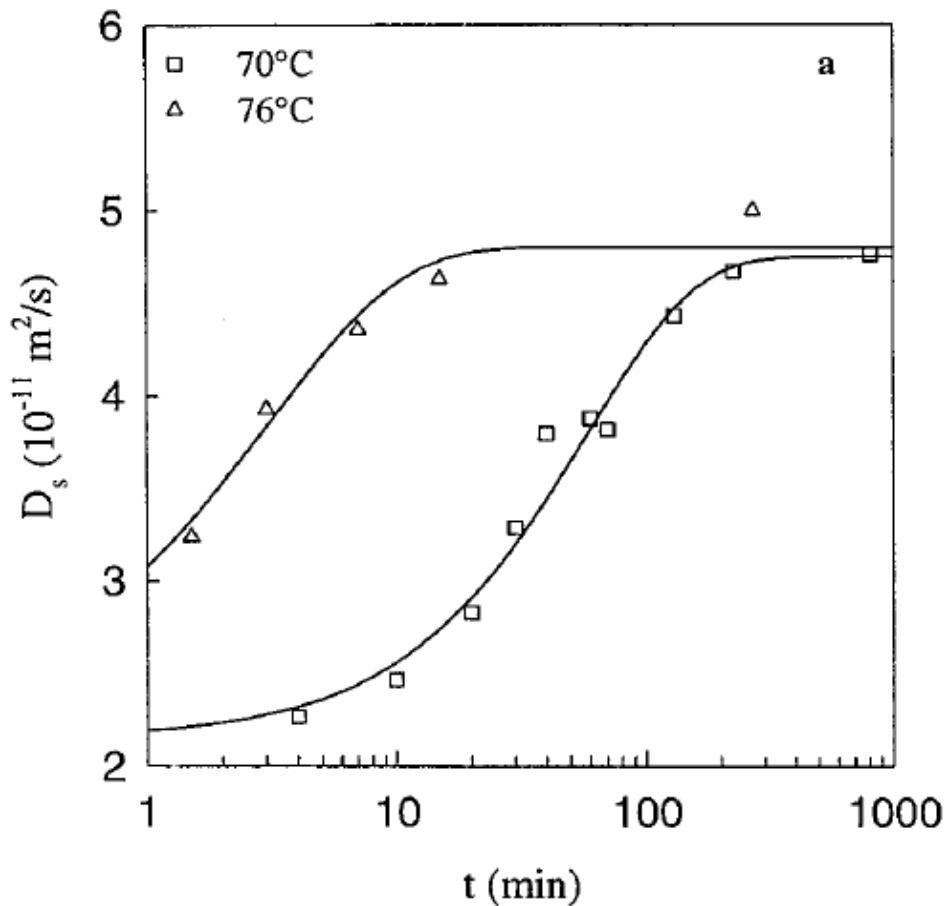


Figure 8 Coefficient d'autodiffusion de la β -lg à $C = 179$ g/L en fonction du temps de chauffage à deux températures indiquées sur la figure (Croguennoc et al 2001).

La figure 9 montre la variation relative des D_s de dextrans de différentes masses molaires ($D_1 : 7 \times 10^6$ g/mol, $D_2 : 2,5 \times 10^5$ g/mol, $D_3 : 6,2 \times 10^4$ g/mol) dans une solution de β -lg à $C = 70$ g/L avec 0.1 M NaCl en fonction du temps de chauffage à 70 °C. On voit que D_s diminue lors du traitement thermique et ce d'autant plus si le dextran ajouté est grand. On observe que la température influence uniquement la cinétique d'agrégation et que les données obtenues à différentes températures se superposent si le temps de chauffage est normalisé par le temps de gelification. L'autodiffusion du dextran diminue rapidement autour du temps de gel, puis reste constante (Croguennoc et al 2001).

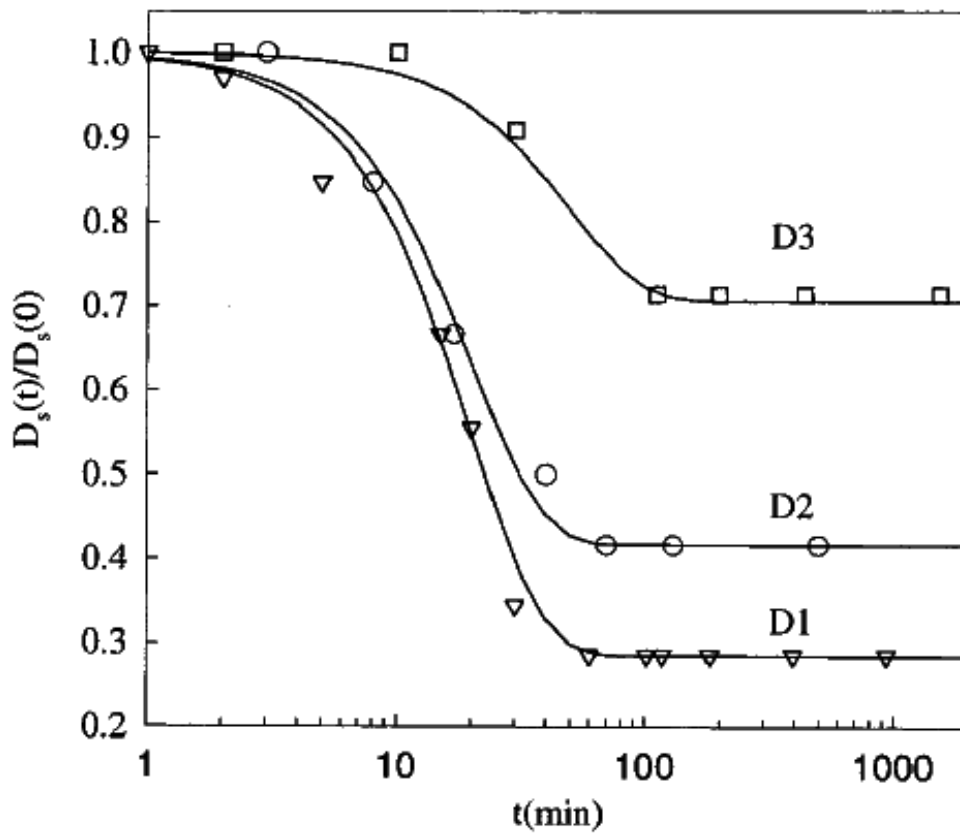


Figure 9 Coefficient d'autodiffusion de trois échantillons du dextran ($D_1 = 7 \times 10^6$ g/mol, $D_2 = 2,5 \times 10^5$ g/mol, $D_3 = 6,2 \times 10^4$ g/mol) dans une solution à 70 g/L de β -Ig avec 0,1 M NaCl à pH 7 en fonction du temps de chauffage à 70 °C (Croguennoc et al 2001).

Référence

AKO Komla, G-G., (2010). Etude de la structure des gels protéiques par Microscopie confocale. Thèse de doctorat en Chimie et physicochimie des polymères.

Aymard, P., Durand, D., Nicolai, T. (1996). The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19, 213-221.

Aymard, P., Durand, D., Nicolai, T. (1995). A Comparison of the Structure of β -Lactoglobulin Aggregates Formed at pH7 and pH2. *Int. Journal Polymer Analysis & Characterization*, 2, 115-119.

Badley, RA., Atkinson, D., Hauser, H., Oldani, D. (1975). The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 412, 214-228.

Barnes, HA. (2000). A handbook of elementary rheology. The University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 119-139.

Brooks, JR., Morr, CV. (1985). Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62, 1347-1348.

Bryant, CM., McClements, DJ. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat- denatured whey. *Elsevier Science*, 9, 143-151.

Cayot, P., Lorient, D. (1998). Structures et technofonctions des protéines du lait. Tech&Doc Paris.

Chen, N., Zhao, M., Chassenieux, C., Nicolai, T. (2016). Thermal aggregation and gelation of soy globulin at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 61, 740-746.

Chen, N., Zhao, M., Niepceron, F., Nicolai, T., Chassenieux, C. (2017). The effect of the pH on thermal aggregation and gelation of soy proteins. *Food Hydrocolloids*, 66, 27-36.

Colsenet, R., Derman, OS., Mariette, F. (2006). Pulsed field gradient NMR study of Poly(ethylene glycol) Diffusion in Whey Protein Solutions and Gels. *Macromolecules*, 39, 1053-1059.

Conchello, J., Lichtman, J.W. (2005). Optical sectioning microscopy. *Nature Publishing Group (npg)*, 2, 920-931.

Croguennoc, P., Nicolai, T., Kuil, ME., Hollander, JG. (2001). Self-diffusion of native proteins and dextran in heat-set globular protein gels. *J. Phys. Chem. B*, 105, 5782-5788.

Croguennec, T., Mollé, D., Mehra, R., & Bouhallab, S. (2004). Spectroscopic characterization of heat-induced non native β -lactoglobulin monomers. *Protein science*, 13, 1340-1346.

Deschout, H., Hagman, J., Fransson, S. (2010). Straightforward FRAP for quantitative diffusion measurements with a laser scanning microscope. *Optics express*.

Foffi, G., Sciortino, F., Tartaglia, P. (2003). Structural arrest in dense star-polymer solutions. *Physical review letters*.

Fox, P., Lorient, D. (1989). *Developments in dairy chemistry*. Elsevier applied science, 145-239.

Garcia-Salinas, MJ., F.J. de las Nieves. (1998). A study of the primary electroviscous effect in monodisperse carboxyl polystyrene latex suspensions. *Progress in Colloid & Polymer Science*, 110, 134-138.

Genovese, DB. (2012). Shear rheology of hard-sphere, dispersed, and aggregated suspensions and filler-matrix composites, *Advances in Colloid and Interface Science*.

George D., Phillis, J. (1987). Dynamics of polymers in concentrated solutions: The Universal Scaling Equation Derived, *Macromolecules*, 20, 558-564.

Guo, J., Xiao-Quan Yang, XQ., He, XT., et al. (2012). Limited aggregation behavior of beta-conglycinin and its terminating effect on glycinin aggregation during heating at pH 7.0. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3782–3791.

Gu, X., Campbell, LJ., Euston, SR. (2009). Effects of different oils on the properties of soy protein isolate emulsions and gels. *Food Research International*, 42, 925–932.

Hambling, S. G., Mc Alpine, A. S., & Sawyer, L. (1992). β -lactoglobulin. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced dairy chemistry*. Elsevier Applied Science, 141-190.

Hollar, CM., N. Parris, et al. (1995). Factors affecting the denaturation and aggregation of whey proteins in heated whey protein concentrate mixtures. *Journal Dairy Science*, 78, 260-267.

Jung, JM., G. Savin, et al. (2008). Structure of heat-induced β -Lactoglobulin aggregates and their complexes with Sodium-Dodecyl Sulfate. *Biomacromolecules*, 9, 2477–2486.

Kinsella, JE., Whitehead, DM. (1989). Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Advances in food and nutrition research*, 33, 343-438.

Le Bon, C., Durand, D., & Nicolai, T. (2002). Influence of genetic variation on the aggregation of heat-denatured β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 12, 671-678.

Le Bon, C., Nicolai, T. (1999). Self-Diffusion and Cooperative Diffusion of Globular Proteins in Solution. *J. Phys. Chem*, 103, 10294-10299.

Loren, N., Nyden, M., Hermansson, AM. (2009). Determination of local diffusion properties in heterogeneous biomaterials. *Advances in Colloid and Interface Science*, 150, 5-15.

- Mackie, J.S., Meares, P. (1955). The sorption of electrolytes by a cation-exchange resin membrane. The royal society of London, series A, Mathematical and Physical Sciences, 232, 485-498.
- Mahmoudi, N., Mehalebi, S., Nicolai, T., Durand, D., & Riaublanc, A. (2007). Light scattering study of the structure of aggregates and gels formed by heat-denatured whey protein isolate and β -lactoglobulin at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3104-3111.
- Majhi, R., Ganta, R., P.Vanam. (2006). Electrostatically Driven Protein Aggregation: β -Lactoglobulin at Low Ionic Strength. *Langmuir*.
- Maruyama, N., Adachi, M., Takahashi, K., et al. (2001). Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers. *Eur. J. Biochem.* 268, 3595-3604.
- Masaro, L., Zhu, XX. (1999). Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in polymer science*, 24, 731-775.
- Mehalebi, S., Nicolai, T., & Durand, D. (2008). Light scattering study of heat denatured globular protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 129-135.
- Nicolai, T. (2015). Formation and functionality of self-assembled whey protein microgels. *Colloids and surfaces B : Biointerfaces*, 137, 32-38.
- Nicolai, T., Britten, M., Schmitt, C. (2011). β -lactoglobulin and WPI aggregates: formation, structure and applications. *Food hydrocolloids*, 25, 1945-1962.
- Nicolai, T., Durand, D. (2013). Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18, 249-256.
- Nze, R.P., Nicolai, T., Chassenieux, C., Nicol, E. (2015). Effect of connectivity on the structure and the liquid-solid transition of dense suspensions of soft colloids. *Macromolecules*, 48, 7995-8002.
- Phan-Xuan, T., Durand, D., Nicolai, T. (2011). On the crucial importance of the pH for the formation and self-stabilization of protein microgels and strands. *Langmuir*, 27, 15092-15101.
- Renard, D., Lefebvre, J., Griffin, M. C. A., Griffin, W. G. (1998). Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22, 41-49.
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuillomenet, A. M., Rouvet, M., Bovetto, L., Barbar, R., et al. (2009). Multiscale characterization of individualized β -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. *Langmuir*, 25, 7899-7909.
- Schweizer, J., KS. (2011). Glassy dynamics and mechanical response in dense fluids of soft repulsive spheres. I. Activated relaxation, kinetic vitrification, and fragility. *The Journal of chemical physics*, 134, 204908.

Tsenoglou, C. (1989). Rubber elasticity of cross-linked networks with trapped entanglements and dangling chains. *Macromolecules*, 22, 284-289.

Vlassopoulos, D., Cloitre, M. (2014). Tunable rheology of dense soft deformable colloids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19, 561–574.

Vlassopoulos, D., Fytas, G. (2009). From polymers to colloids: engineering the dynamic properties of hairy particles. *High Solid Dispersions*, 1-54.

Chapitre II : Matériaux et Méthodes

II.1 Matériaux

II.1.1 Beta-lactoglobuline (β -lg)

La β -lactoglobuline (Biopure, lot JE 001-8-415) utilisée pour ce travail a été fournie par Davisco Foods International (Le Sueur, MN, USA). La poudre contient 89,6 % en poids de protéine (Kjeldahl, N x 6,8) et sa composition protéique est de 55,4 % et 41,6 % des variants A et B respectivement et moins de 2 % d'autres protéines du lactosérum (Schmitt et al 2009). La poudre est dissoute dans l'eau Milli-Q avec 200 ppm de NaN_3 pour éviter le développement bactérien dans la solution. Après avoir agité la solution toute la nuit à température ambiante, le pH de la solution est fixé en ajoutant de la soude 0,1 M sous agitation. La solution native de β -lg est ensuite filtrée à travers des filtres Anotop dont la taille des pores était comprise entre 0,45 μm et 0,2 μm , la concentration en protéine est ensuite mesurée par spectroscopie UV-Visible en utilisant la loi de Beer-Lambert. L'absorbance maximale utilisée est observée à la longueur d'onde de 278 nm et le coefficient d'extinction utilisé est de 0,96 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. La masse molaire de la β -lg a été mesurée en utilisant la diffusion de la lumière et vaut de $1,8 \times 10^4$ g/mol avec un rayon hydrodynamique d'environ 2 nm (Nicolai et al 2011). La solution native de β -lg est conservée à environ 4 °C avant utilisation.

II.1.2 Protéine de lactosérum (WPI)

Les protéines de lactosérum (Prolacta®95, batch A13023) a été fournie par Nestlé-CRN (Lausanne, Switzerland). La poudre isolée a été obtenue par microfiltration et ultrafiltration de lait écrémé pasteurisé à basse température pour limiter la dénaturation de la protéine. La poudre de WPI contient 91 g de protéine (Kjeldahl, N x 6,8) pour 100 g de poudre. La protéine de lactosérum contient 65 % en poids de β -lg, 20 % en poids de α -lactalbumine (α -lac) et d'autres protéines telles que l'albumine de sérum bovin (BSA). La poudre de WPI est dispersée dans l'eau Milli-Q avec 200 ppm de NaN_3 pour éviter la croissance bactérienne, la solution est agitée une nuit à température ambiante. La solution est ensuite centrifugée (centrifugeuse Allegra 64R Beckman Coulter, États-Unis) à 50 000 G à 20 °C pendant 2 h. Le surnageant a été filtré à travers des filtres Anotop dont la taille des pores

était comprise entre 0,45 μm et 0,2 μm . Le pH de la solution est fixé à 7 en ajoutant du NaOH 0,1 M. La teneur en protéine dans la solution a été déterminée en mesurant l'absorbance par spectroscopie UV-Visible à 278 nm en utilisant un coefficient d'extinction de 1,04 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ valeur basée sur les proportions de β -lg et d' α -lac dans le WPI connaissant leur coefficient d'extinction respectif. La masse molaire du WPI a été mesurée en utilisant la diffusion de la lumière, elle vaut $1,7 \times 10^4$ g/mol avec un rayon hydrodynamique d'environ 2 nm. La solution native est conservée à froid avant utilisation.

II.1.3. Protéine de soja (SPI)

L'isolat de protéine de soja utilisé pour ce travail a été fourni par Nestlé-CRN (Lausanne, Switzerland). La poudre est dispersée dans de l'eau de Milli-Q avec 200 ppm de NaN_3 pour éviter la croissance bactérienne, la solution est agitée à température ambiante pendant une nuit. La solution de SPI est ensuite centrifugée (centrifugeuse Allegra 64R Beckman Coulter, États-Unis) à une vitesse de 50 000 G pendant 4 h à 20 °C, 35 % de la protéine sous forme d'agrégats est ainsi éliminée. Le surnageant est dialysé contre de l'eau Milli-Q en présence de 200 ppm NaN_3 pendant 72 h pour éliminer l'isoflavone. La figure 1a représente les spectres UV des solutions avant et après dialyse. On constate que le maximum d'absorbance à 259 nm dû à l'isoflavone a disparu après dialyse. La solution dialysée a été reconcentrée par Ultrafiltration (krosFlo Research II/i/Tangential Flow Filtration (TFF) system (Spectrum Europa B.V.) puis son pH a été fixé à 7 en ajoutant du NaOH 0,1 M. Après avoir filtré la solution native à travers des filtres Anotop dont la taille des pores était comprise entre 0,45 μm et 0,2 μm la concentration en SPI de la solution a été déterminée en utilisant l'absorbance maximale à 278 nm et le coefficient d'extinction de 0,93 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (mesuré avec le nombre du Kjeldahl de N x 5,6). La masse molaire de SPI est de $6,5 \times 10^5$ g.mol⁻¹ et son rayon hydrodynamique est d'environ 11 nm (figure1b).

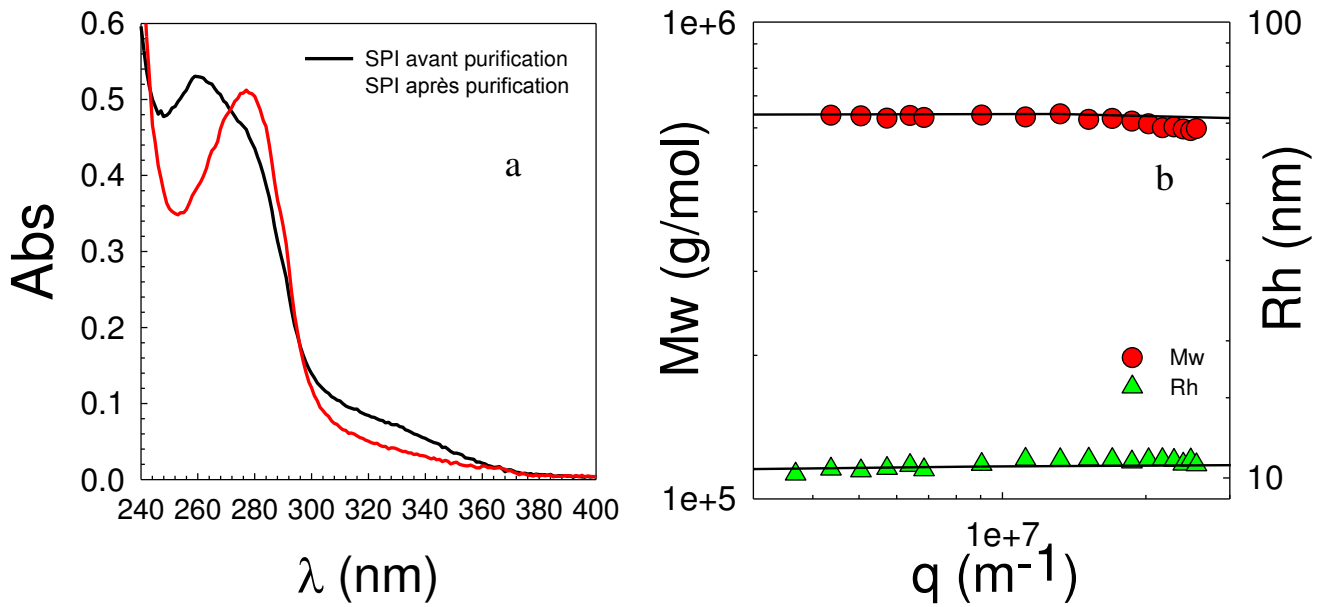


Figure 1 (a) spectre d'absorbance du SPI en fonction de la longueur d'onde avant et après purification, on mesure à 259 nm et 278 nm le maximum d'absorbance respectivement de l'isoflavone et du SPI ($C = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$). (b) Variation de la masse molaire (Mw) et du rayon hydrodynamique (Rh) du SPI purifié en fonction du vecteur d'onde mesurés par diffusion de la lumière.

II.1.4 FITC-dextran

On a utilisé des molécules de dextran marquées par des fluorophores (FITC-dextran) fournies par Sigma-Aldrich et présentant différentes masses molaires comme traceurs dans les suspensions denses et dans les gels d'agrégats de protéines sériques. La distribution des masses molaires de ces dextrans a été mesurée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) dans l'eau et les résultats sont rassemblés tableau 1.

Référence	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	Đ
D70	62 000	71 000	1,1
D500	264 000	480 000	1,8

Tableau 1 Masses molaires et dispersités des Dextran FITC D70 et D500 mesurées par chromatographie d'exclusion stérique.

II.2 Méthodes

II.2.1. Centrifugation

Les expériences de centrifugation ont été effectuées à température ambiante avec une centrifugeuse Allegra 64R (Beckman Coulter, USA) à une vitesse de 50 000 G pendant 2 h pour la solution native de WPI et 4 h pour la solution native de SPI. Le surnageant a été récupéré et le pH a été fixé à 7 avant de filtrer la solution.

II.2.2. UV-Visible

La teneur en protéine (C) a été déterminée en mesurant l'absorbance à 278 nm (A_{278}) dans une cuve en quartz de longueur l. Les solutions ont été diluées à environ 1 g/l. Le coefficient d'extinction (ϵ) a été pris comme égal à 0,96 L.g⁻¹.cm⁻¹, 1,04 L.g⁻¹.cm⁻¹ et 0,93 L.g⁻¹.cm⁻¹ pour β -lg, WPI et SPI respectivement. C a été calculée en utilisant la relation Beer-Lambert.

$$C = \frac{A_{278}}{\epsilon.l} \quad \text{Eq.(4)}$$

II.2.3. Chromatographie d'exclusion stérique

Les expériences de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ont été effectuées avec un ensemble de colonnes TSK PW 5000 + PW 6000 (30 cm + 60 cm) en série avec une pré-colonne Zorbax GF-450 (25 cm). On utilise trois détecteurs (un réfractomètre différentiel, un spectromètre UV-Visible et un détecteur diffusion de la lumière multiangle) qui sont disposés en sortie de colonnes. On injecte 300 μ l des solutions à analyser à l'aide d'un système d'injection automatique (Auto-injecteur 234, Gilson) à une concentration d'environ 0,5 g/l. Les solutions ont été éluées à 20 °C avec NaNO₃ 0,1 M à pH 7 comme éluant à un débit de 1 ml/min.

II.2.4. Réfractométrie différentielle

On utilise un réfractomètre différentiel (Optilab rEXWyatt-822, de Wyatt Technology Corporation) à une longueur d'onde de 633 nm pour mesurer la différence d'indice de réfraction entre une solution et le solvant pur (D_n). Des solutions de protéines à des concentrations comprises entre 0,5 g/l et 3,5 g/l ont été injectées. La Figure 2 montre un résultat typique obtenu pour le SPI, l'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) est défini comme la pente de la droite obtenue dans une telle représentation. La réfractométrie différentielle s'avère être une méthode facile à mettre en œuvre pour mesurer la concentration absolue d'une solution de protéines avec la valeur mesurée de (dn/dc) de WPI et SPI de 0,189 ml/g.

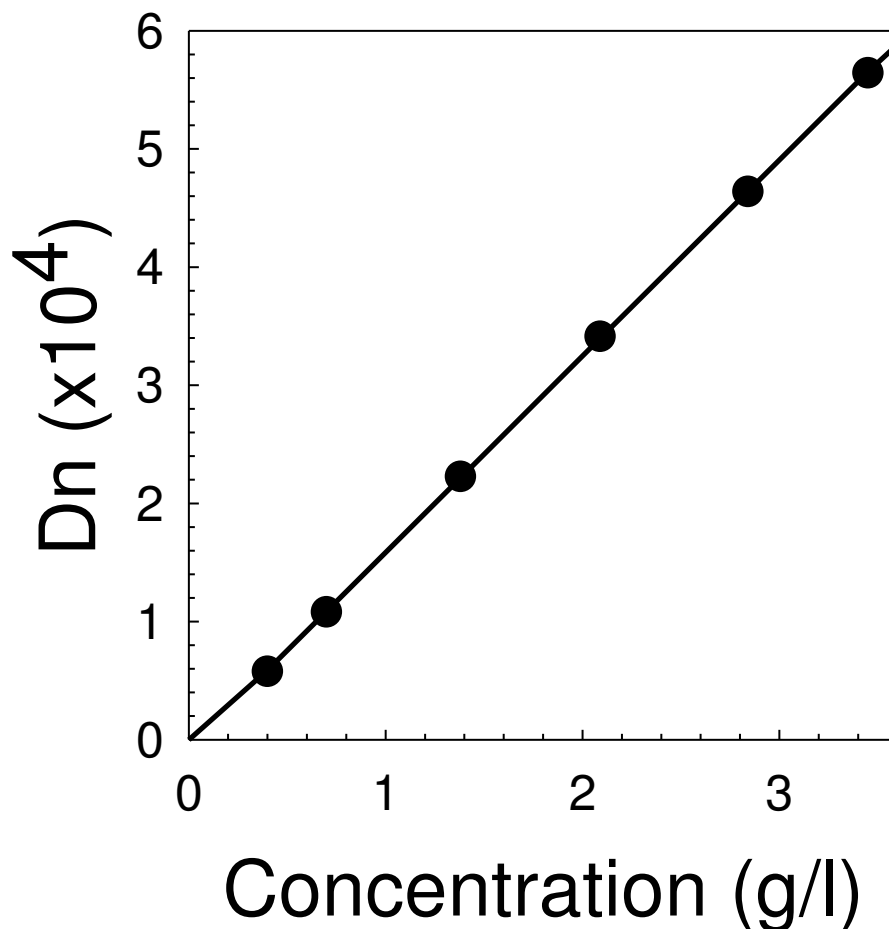


Figure 2 Evolution avec la concentration de la différence d'indice de réfraction entre une solution de SPI purifiée et son solvant (eau MilliQ avec 200 ppm de NaN_3).

II.2.5. Titrage potentiométrique

Le titrage potentiométrique a pour objectif de déterminer la quantité d'unités acides ou basiques présentes dans la solution de protéine en suivant l'évolution du pH de la solution lors de l'addition d'un titrant. Dans notre cas, il nous a permis de quantifier la densité de charge des protéines et de leurs agrégats (α).

Les mesures de titrage ont été réalisées à température ambiante à l'aide du titrateur automatique TIM 856 piloté par le logiciel TitraMaster 85 équipé d'une électrode de pH combinée et d'une sonde de température. L'électrode de pH a été étalonnée par un étalonnage à trois points en utilisant des tampons standards (pH = 4, 7 et 10).

Le pH de tous les échantillons a d'abord été amené à 8,0 par addition d'une solution étalon de NaOH 0,1 M puis titré jusqu'à pH 4 avec une solution étalon de HCl 0,1 M. On prend soin de noter la quantité de soude ajoutée pour amener la solution de pH initial connu à 8. La vitesse optimale d'addition de HCl a été prise égale à 0.1 mL/min (voir l'article 2 correspondant en annexe numéro 2). La concentration en HCl a été choisie suffisamment faible pour éviter l'agrégation des protéines et de leurs agrégats au cours du dosage.

La densité de charge nette des protéines est calculée selon l'équation suivante :

$$\Delta\alpha = \frac{V(HCl) \times [HCl] - V(NaOH) \times [NaOH]}{m/M_w} \quad \text{Eq.(5)}$$

Où $V(T)$ et $[T]$ représentent les volumes et les concentrations respectifs en HCl et NaOH utilisés pour une masse de protéine m de masse molaire M_w (on a pris $M_w = 1.75 \cdot 10^4$ g/mol pour le WPI). Lorsqu'on compare les courbes de titration du WPI et de la β -lactoglobuline, on ne note pas de différence entre les deux types de protéines.

La figure 3 montre que la dépendance du pH à la densité de charge des protéines est significativement différente après agrégation. Le pH a un effet sur la structure globale, mais pas sur la taille globale, ce qui est attendu puisque la protonation des acides aminés est influencée par leur environnement local. A pH équivalent, (pH 7) on voit qu'il n'y a pas d'influence de la taille des agrégats sur la densité de charge.

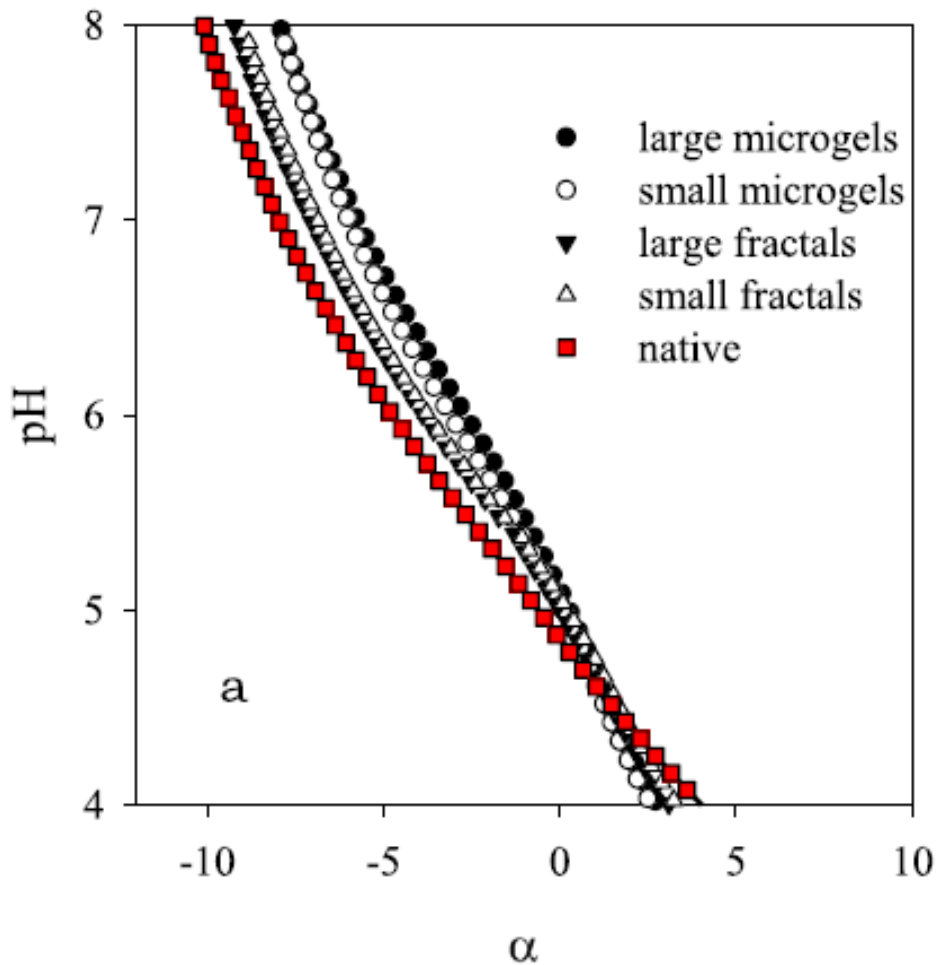


Figure 3 Comparaison du pH en fonction de la densité de charge nette pour le WPI natif, des agrégats fractals ($R_h = 35$ et 165 nm) et des microgels ($R_h = 100$ et 370 nm) à $C = 10$ g/L solutions sans sel.

II.2.6.Ultrafiltration

L'ultrafiltration est un procédé de reconcentration et de purification de protéines à travers une membrane poreuse qui joue le rôle d'un tamis pour éliminer des molécules qui sont plus petites que la taille des pores des membranes comme l'eau ou l'isoflavone. Cette technique permet d'augmenter la concentration des solutions de protéines sans altérer leur structure

initiale en éliminant la phase aqueuse. Les solutions de protéines ont été concentrées en utilisant un dispositif KrosFlo Research II/i/Tangential Flow Filtration (TFF) System (Spectrum Europa B.V.) à un débit de 5ml/min. Le seuil de rétention des membranes utilisées est de 3000 g/mol et de 10 000 g/mol respectivement pour le WPI et le SPI.

La figure 4 montre la taille des agrégats (R_h) avant et après avoir été reconcentrés par l'ultrafiltration. Initialement leur concentration est de 40 g/L (les agrégats de WPI ont alors une taille de 16 nm). Après reconcentration à 130 g/L, on constate que la taille des agrégats n'a pas changé. Il convient de dire que pour réaliser ces mesures, les solutions ont été diluées à une concentration inférieure à 1 g/L pour s'affranchir des interactions comme expliqué dans le chapitre III. Néanmoins, à cette concentration importante, les solutions d'agrégats de WPI ne sont pas stables dans le temps. Il faut donc les utiliser et les caractériser rapidement et les stocker à faible température.

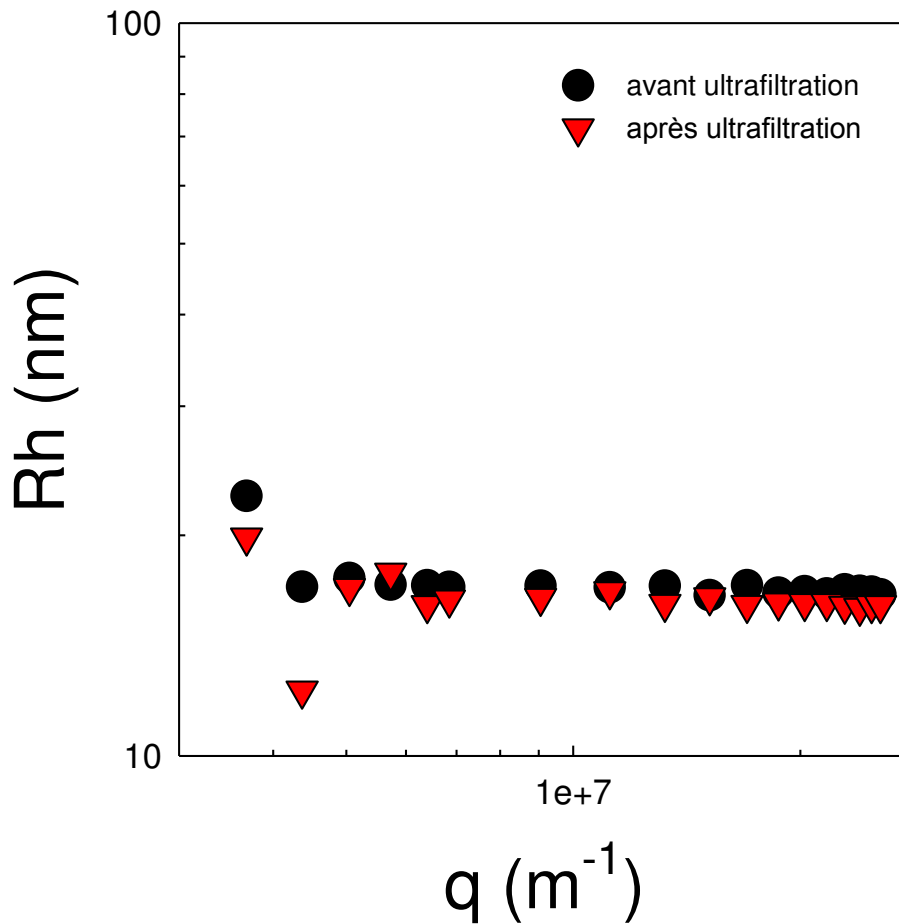


Figure 4 Influence du procédé d'ultrafiltration sur la dépendance angulaire du rayon hydrodynamique de petits agrégats de WPI. Initialement la concentration est de 40 g/L après ultrafiltration elle est de 130 g/L.

Le même procédé d'ultrafiltration a été utilisé pour les mélanges d'agrégats fractals de petite (16 nm) et grande taille (117 nm) dont on reparlera au chapitre III. Les mélanges sont préparés à une concentration de 100 g/L et reconcentrés à 120 g/L, la figure 5 illustre que le procédé d'ultrafiltration n'a pas de conséquence sur la dépendance angulaire de la taille et du facteur de structure des mélanges. Cela signifie que l'augmentation de la concentration des mélanges par le procédé d'ultrafiltration ne conduit pas à une agrégation supplémentaire voire à une gélification si toutefois on conserve les mélanges reconcentrés à froid et peu de temps après leur reconcentration.

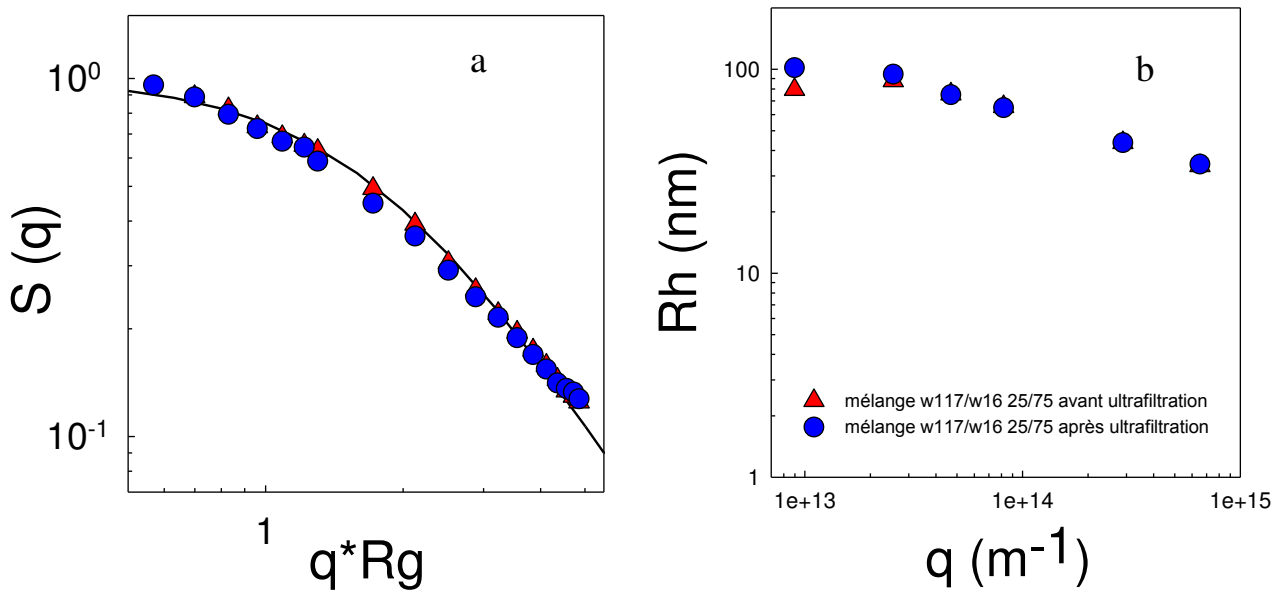


Figure 5 Influence du procédé d’ultrafiltration sur (a) le facteur de structure et (b) la dépendance angulaire du rayon hydrodynamique de mélange 25/75 de gros (117 nm) et petits (16 nm) agrégats de WPI. Initialement la concentration est de 100 g/L après ultrafiltration elle est de 120 g/L, la ligne continue dans la courbe a correspond à l’équation 12.

II.2.7. Diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière est une méthode non destructive qui convient parfaitement à l’étude des protéines. Cette technique permet d’étudier les propriétés statiques et dynamiques des particules pour déterminer leur structure en solution. Le principe consiste à envoyer un rayonnement laser monochromatique à travers un échantillon. Quand le rayonnement percute l’échantillon, il est diffusé par ce dernier et on collecte le rayonnement diffusé par les particules en fonction de q qui est le vecteur de diffusion. L’amplitude du rayonnement diffusé dépend du pouvoir diffusant des particules et de la distance échantillon-détecteur R (voir la figure 6). Les protéines sont généralement suffisamment grandes et possèdent un contraste important en solution pour être des diffuseurs forts à faible concentration.

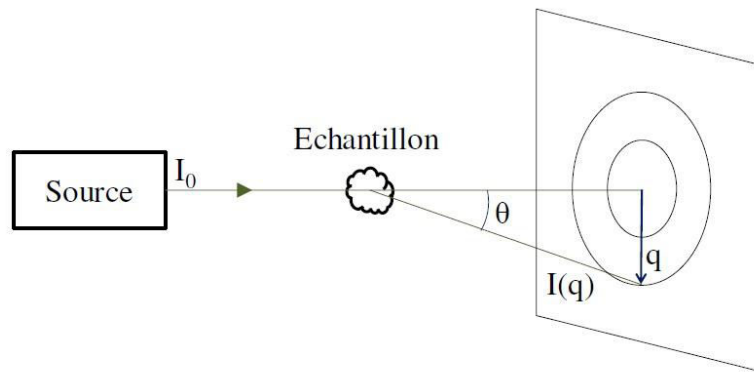


Figure 6 Principe d'une expérience de diffusion de la lumière.

II.2.7.1. Diffusion statique de la lumière

Dans le cas d'un liquide pur, les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée proviennent essentiellement des fluctuations de densité et de température (souvent négligeables). Si on considère maintenant une solution, il faut ajouter des fluctuations de concentration. Pour des concentrations suffisamment faibles, les fluctuations de densité de la solution sont équivalentes à celles du solvant pur, l'excès d'intensité diffusée n'est alors dû qu'aux fluctuations de concentration. L'intensité diffusée fluctue dans le temps (voir la figure 7) à cause des inhomogénéités locales dans l'échantillon induites par des fluctuations de densité du solvant et de concentration des centres diffusants.

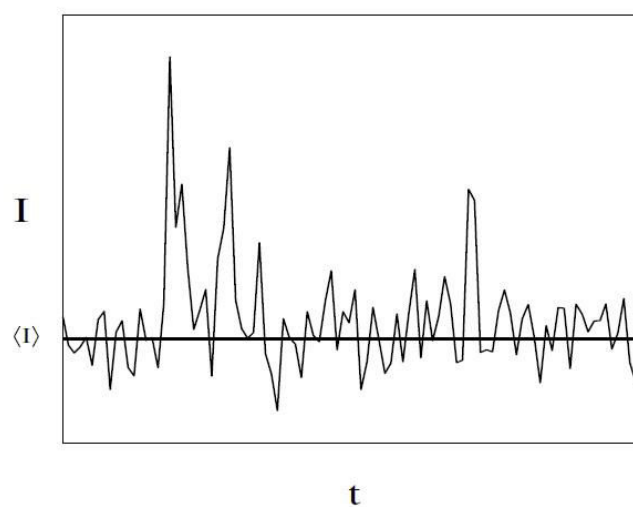


Figure 7 Fluctuations temporelles de l'intensité diffusée autour de la valeur moyenne de l'intensité.

Lorsque l'on effectue des mesures de diffusion statique de la lumière (SLS), on utilise la valeur moyenne de l'intensité diffusée par l'échantillon à différents angles d'observation (Θ). L'intensité obtenue I_Θ est ensuite corrigée par l'intensité diffusée par le solvant (I_{sol}) et divisée par l'intensité d'une référence (le toluène dans notre cas) I_{tol} dont le rapport de Rayleigh est connu ($R_{\Theta-tol} = 1,36 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ à $\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$).

On détermine le rapport de Rayleigh de la solution R_Θ , en tenant compte des indices de réfraction du solvant ($n_{sol} = 1,333$) et de la référence ($n_{tol} = 1,496$) selon l'équation :

$$R_\Theta = \frac{I_\Theta - I_{sol}}{I_{tol}} R_{\Theta-tol} \left(\frac{n_{tol}}{n_{sol}} \right)^2 \quad \text{Eq. (6)}$$

Le rapport de Rayleigh en milieu dilué est proportionnel à la concentration massique de particule diffusante (C), à leur masse molaire moyenne en masse (M_w) et à leur facteur de structure ($S(q)$) selon l'équation suivante :

$$R_\Theta = K \cdot C \cdot M_w \cdot S(q) \quad \text{Eq. (7)}$$

Où K est une constante d'appareillage tenant compte du contraste :

$$K = \frac{4\pi^2 n_{sol}^2}{\lambda_0^4 \mathcal{N}_A} \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 \quad \text{Eq.(8)}$$

Avec \mathcal{N}_A le nombre d'Avogadro et $\left(\frac{dn}{dC} \right)$ l'incrément d'indice de réfraction mesuré avec un réfractomètre différentiel (voir II.2.4).

En pratique l'équation de Zimm permet d'analyser la dépendance angulaire et en concentration de $\frac{K \cdot C}{R_\Theta}$ pour des solutions diluées d'objets relativement petits selon l'équation :

$$\frac{K \cdot C}{R_\Theta} = \left(\frac{1}{M_w} + 2 \cdot A_2 \cdot C \right) \left(1 + \frac{q^2 R_g^2}{3} \right) \quad \text{Eq.(9)}$$

$$\text{Avec } q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\Theta}{2} \quad \text{Eq.(10)}$$

- M_w la masse molaire moyenne en masse

- A_2 le second coefficient du viriel qui signifie de l'écart à l'idéalité de la solution dû aux interactions binaires entre les molécules

- R_g le rayon de giration

Toujours pour les solutions diluées (C tend vers 0), il est possible de négliger les interactions entre particules et on obtient alors :

$$S(q) = \frac{R_\theta}{KCM_w} \quad \text{Eq.(11)}$$

Le calcul de $S(q)$ nécessite de connaître la fonction de corrélation de paire $g(r)$ de l'agrégat. Ceci est possible dans le cas d'agrégats avec des géométries simples et bien déterminées mais la plupart du temps ce calcul est impossible.

- cas où $qR_g \ll 1$

On obtient par des développements limités l'expression de $S(q)$ suivante :

$$S(q) = \frac{1}{1 + \frac{q^2 R_g^2}{3}} \quad \text{Eq.(12)}$$

Où on peut calculer le rayon de giration des particules.

-cas où $qR_g \gg 1$

Les processus d'agrégation en solution conduisent le plus souvent à la formation d'objets ayant à la fois des structures et des distributions auto-similaires. On parle alors d'objet fractal caractérisé par une dimension fractale D_f reliant la masse molaire en masse (M_w) à la taille par la relation :

$$M_w \propto (R_g)^{D_f} \quad \text{Eq.(13)}$$

Le facteur de structure suit une loi de puissance de la forme :

$$S_{(q)} \propto q^{-D_f} \quad \text{avec } 1 < D_f < 3 \quad \text{Eq.(14)}$$

II.2.7.2. diffusion de la lumière dynamique

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) donne des informations sur le rayon hydrodynamique (R_h) des particules ou le rayon apparent (R_a) si les interactions entre particules ne peuvent pas être négligées. La fonction d'auto-corrélation de l'intensité diffusée normalisée ($g_2(t)$) est obtenue à partir de la mesure des fluctuations de l'intensité diffusée et est liée à la fonction de corrélation du champ électrique normalisée ($g_1(t)$) par l'équation 15, $g_1(t)$ a été analysée en termes de répartition des temps de relaxation en utilisant la routine REPES (équation 16)

$$g_2(t) = 1 + g_1(t)^2 \quad \text{Eq.(15)}$$

$$g_1(t) = \int A(\log\tau) \exp(-t/\tau) d\log\tau \quad \text{Eq.(16)}$$

Des distributions monomodales ont été observées et les corrélogrammes peuvent être bien décrits en utilisant l'expression analytique suivante pour $A(\log\tau)$

$$A(\log\tau) = K\tau^p \exp \left[-\left(\frac{\tau}{\tau^*}\right)^s \right] \quad \text{Eq.(17)}$$

- τ temps de relaxation

- p et s sont des paramètres qui décrivent la largeur et l'asymétrie de la distribution des temps de relaxation.

Dans les solutions binaires, la relaxation des fluctuations d'intensité est causée par la diffusion coopérative du soluté et le coefficient de diffusion (D) peut être calculé à partir du taux de relaxation moyen τ (l'équation 18). La longueur de corrélation dynamique (ξ_d) peut être calculée à partir de D à $q \rightarrow 0$:

$$D = (q^2 \cdot \tau)^{-1} \quad \text{Eq.(18)}$$

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta\xi_d} \quad \text{Eq.(19)}$$

Avec η la viscosité du solvant, k la constante de Boltzman et T la température. Lorsque les interactions peuvent être négligées c'est-à-dire à faible concentration en protéine ξ_d est égale au rayon hydrodynamique (R_h).

Les mesures de diffusion de la lumière (statique et dynamique) ont été réalisées sur un système ALV. Celui-ci comporte un goniomètre compact (ALV / CGS-3), un corrélateur (ALV-5000) et un logiciel de contrôle et d'exploitation des données (ALV/LES-5004). La source lumineuse est un laser He-Ne de longueur d'onde $\lambda_0 = 632,8$ nm. La tête goniométrique permet des mesures angulaires de 12 à 150°, ce qui correspond à une échelle spatiale (q^{-1}). La corrélation des photons, pour la DLS, est assurée par un corrélateur digital. On obtient alors la fonction d'auto-corrélation normalisé de l'intensité $g_2(t)$, d'où découle la fonction d'auto-corrélation normalisée du champ électrique $g_1(t)$.

II.2.8. Rhéologie

La rhéologie est une des principales techniques qui permet d'obtenir des informations sur la structure de la matière en étudiant ses propriétés mécaniques.

En écoulement, on étudie la somme des forces (F) appliquée à un échantillon qui induit une contrainte (σ) parallèlement à la surface de l'échantillon ce qui conduit à une déformation γ (voir la figure 8)

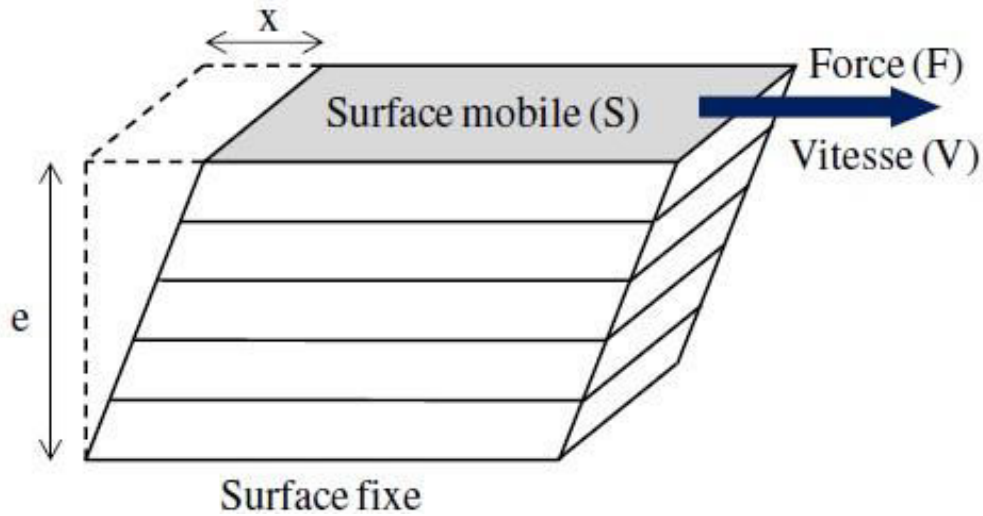


Figure 8 Représentation de l'écoulement laminaire d'un matériau entre deux surfaces.

Lorsque la déformation γ est dérivée par rapport au temps, le taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) est obtenu et la viscosité dépendante de la vitesse de cisaillement est définie par l'équation 24.

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad \text{Eq.(24)}$$

En dynamique, les mesures sont utilisées pour caractériser des propriétés mécaniques des matériaux en fonction de la contrainte de cisaillement (σ) et de la fréquence d'oscillation. Une contrainte de cisaillement sinusoïdale est imposée avec une fréquence (ω) : $\sigma = \sigma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t)$, et la déformation (γ) résultante est mesurée $\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta)$ où δ est le déphasage. À faible contrainte c'est-à-dire dans le régime linéaire, la déformation γ_0 est proportionnelle à la contrainte de cisaillement σ_0 . Les déformations en phase et en quadrature sont caractérisées par le module élastique (G') et le module de perte (G'') selon :

$$(G')(\omega) = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad \text{Eq.(25)}$$

$$(G'')(\omega) = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad \text{Eq.(26)}$$

$$\tan \delta = \frac{G'}{G''} \quad \text{Eq.(27)}$$

Pour les solides élastiques G' est supérieur à G'' et indépendant de la fréquence alors que pour les liquides newtoniens, G' est inférieur à G'' et les deux modules dépendent de la fréquence imposée $G' \sim \omega^2$ et $G'' \sim \omega^1$. Les matériaux viscoélastiques présentent un comportement élastique à haute fréquence et un comportement liquide à basse fréquence.

Pour les études du comportement rhéologique, les rhéomètres à contrainte imposée qui ont été utilisés sont l'AR2000 et l'ARG2 (TA Instruments, USA) avec des géométries cône-plan et Couette. Les rhéomètres ont été équipés d'un système Peltier pour contrôler la température. Pour des mesures d'oscillation, des échantillons ont été recouverts d'huile de paraffine pour éviter l'évaporation de l'eau. La mesure d'écoulement a été effectuée sans la présence d'huile de paraffine pour que des mesures à haute taux de cisaillements puissent être réalisées et toutes les expériences rhéologiques ont été effectuées à une température de 20 °C. Des artefacts ont été observés à faible taux de cisaillement à cause de la formation d'une couche de protéines à l'interface entre la solution et l'air. On peut minimiser ces artefacts en utilisant une géométrie de type Couette mais cela nécessite des volumes de solution importants. C'est pourquoi on a majoritairement utilisé une géométrie de type cône-plan en se limitant aux plateaux newtoniens mesurés aux plus petites valeurs de taux de cisaillement. Dans ce domaine de taux de cisaillement, les mesures ont été répétées 4 fois avec une très bonne reproductibilité.

II.2.9. Microscopie confocale

La microscopie optique conventionnelle est une technique courante pour étudier les suspensions colloïdales mais les faibles contrastes et la diffusion multiple des objets étudiés constituent des difficultés expérimentales. La microscopie confocale peut résoudre ces problèmes grâce aux différences de formation des images par rapport à celles de microscopie optique. La figure 9 montre le fonctionnement d'un microscope confocale à balayage, la lumière provenant de la source laser passe à travers une ouverture (pinhole d'entrée) qui est située dans un plan conjugué (confocal) avec un balayage de l'échantillon pour produire

l'image scannée. Chaque point de la numérisation est traduit dans l'image par un pixel. La lumière de fluorescence émise et la lumière réfléchie de l'échantillon sont reconduites par le même objectif. Le microscope utilise un miroir dichromatique (module de balayage) qui focalise la lumière émise par le point focal objet sur un deuxième point, le point focal image. Certains atomes et molécules fluorescentes ont la particularité d'absorber la lumière à une longueur d'onde particulière et émettent ensuite à une longueur d'onde plus grande. Ce phénomène est appelé durée de vie de fluorescence. A la température ordinaire, la plupart des molécules sont dans leur état fondamental, cependant elles peuvent absorber un photon qui excite un électron à l'état singulet vers un état d'énergie plus élevée. La fluorescéine est un fluorophore qui agit de cette façon, en émettant de la lumière verte lorsque la lumière d'excitation est bleue. Les longueurs d'ondes de la lumière d'excitation et la couleur de la lumière émise sont indépendantes de l'échantillon.

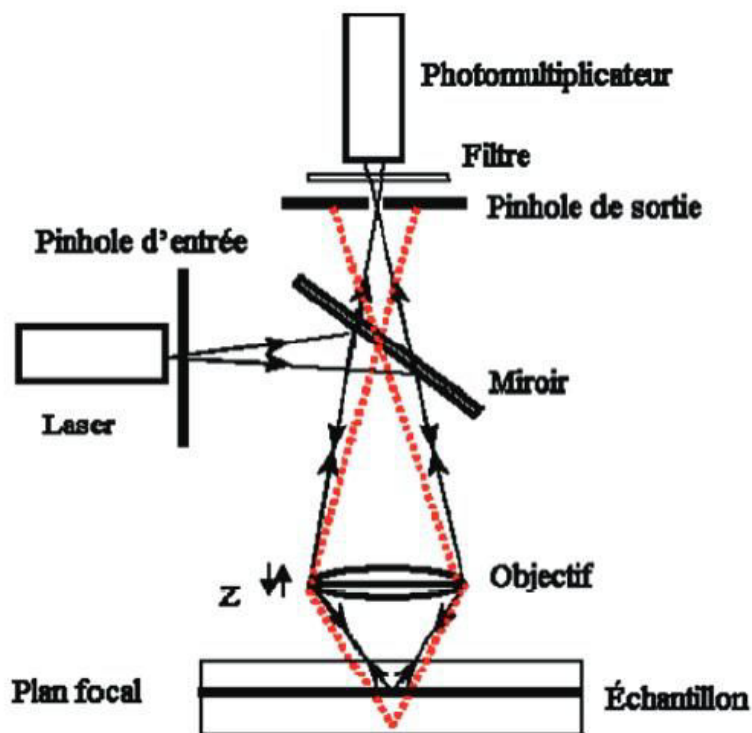


Figure 9 Schéma du fonctionnement de la microscopie confocale (Conchello & Lichtman 2005, Ako 2010).

Dans notre étude, la microscopie confocale à balayage laser a été utilisée en mode fluorescent. Les expériences ont été réalisées avec un microscope Leica TCS-Spé (Leica Microsystems Heidelberg, Allemagne) et un microscope Zeiss LSM800, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). L'objectif du microscope confocal est un composant assez important du système qui permet de déterminer les informations contenues sur l'image. L'efficacité de cet objectif est déterminée par son ouverture numérique (NA) qui définit la performance du réassemblage de la lumière. Dans nos expériences, on a utilisé l'objectif d'immersion à l'eau HCx PL APO 20x with NA = 0,7 avec une résolution théorique de 0,3 μm dans le plan x-y.

II.2.9.1.FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

II.2.9.1.1.Phénomène de photoblanchiment

Le phénomène de photoblanchiment se produit lorsqu'un fluorophore perd définitivement sa capacité à fluorescer à cause des dommages des photons. Le processus de photoblanchiment n'est pas complètement explicité mais on pense que lors de la transition d'un état singulet excité à l'état triplet excité, les fluorophores peuvent interagir avec une autre molécule, ce qui produit des modifications irréversibles. Le nombre moyen de cycles d'excitation et d'émission qui se produisent pour un fluorophore dépend de la structure moléculaire et de l'environnement local. La réaction de photoblanchiment entraîne une perte spectaculaire de l'intensité d'émissions de la fluorescence.

Le dextran marqué par la fluorescéine a été utilisé comme traceur dans des solutions de protéine. La mobilité du dextran dans le milieu est déterminée en utilisant la microscopie confocale et la technique FRAP. La diffusion du traceur dans une région d'intérêt (zone ROI) est enregistrée après avoir éclairé l'échantillon avec le laser à très forte intensité pour que les chromophores présents au sein de la zone ROI soient détruits. Cette réaction est irréversible et la récupération de l'intensité dans le ROI n'est possible que grâce à la diffusion de fluorophores en provenance d'autres endroits de l'échantillon vers la zone ROI concomitante à une diffusion des fluorophores photoblanchis au sein de la ROI en dehors de cette zone. La technique de FRAP est divisée en trois principales étapes qui sont :

- Pré-blanchiment (réalisation d'images avant le photoblanchiment pour établir le niveau initial d'intensité de fluorescence)
- Photoblanchiment (réalisation d'images pendant le photoblanchiment pour établir la conversion initiale)
- Post-photoblanchiment (réalisation d'images périodiquement pour mesurer la recouvrance de la fluorescence)

Des faibles intensités ont été utilisées pour prendre des images avant et après le photoblanchiment de façon à ce que le photoblanchiment résultant de la prise d'images soit négligeable.

II.2.9.1.2. Protocole de FRAP

Les expériences de FRAP ont été réalisées avec une taille d'image de $63 \times 63 \mu\text{m}$ et le zoom 2. La taille de la région de blanchiment était de $30 \times 30 \mu\text{m}$ au centre de l'image. Une faible ouverture numérique de l'objectif (HCx PL APO 20x with NA = 0,7) et une grande région de blanchiment assure une géométrie cylindrique de la zone ROI. Un laser Argon avec une émission maximum de 488 nm a été utilisé. L'intensité du laser a été maintenue à 2 % avant et après le photoblanchiment alors qu'elle était de 100 % pendant le photoblanchiment. Toutes les images ont été stockées sous forme de tif-bit 8 bits avec un format de 512×512 pixels. L'intervalle de temps entre les images avant le photoblanchiment ($t < 0$), pendant ($t = 0$) et après ($t > 0$) a été maintenu à 1s. Ensuite, l'intervalle de temps entre les images a été augmenté (20 s, 20 min et 2 h) pour limiter le photoblanchiment inhérent à la prise d'image. On mesure la diffusion des traceurs jusqu'à atteindre un état stationnaire. Les dextrans FITC ont été ajoutés à une concentration de 0.3 g/L aux suspensions d'agrégats ou de microgels de WPI sur une large gamme de concentration en protéine (10 g/L à 260 g/L). Les solutions de protéines natives sont chauffées directement dans la lamelle de microscopie confocale à 80 °C pH 7 pendant 24 h. Après avoir refroidi l'échantillon à température ambiante la mesure du coefficient de diffusion des dextrans FITC a été effectuée par FRAP. On mesure la recouvrance de de l'intensité de fluorescence dans la zone blanchie (zone de ROI de rayon 15 μm) en fonction du temps. Cette recouvrance s'explique par un échange entre des traceurs non photoblanchis situés en dehors de la zone ROI avec ceux qui ont été photoblanchis. La figure 10 montre un exemple des images prises à différents temps pendant l'expérience de

FRAP effectuée dans un gel de WPI à $C = 120$ g/L chauffé sans sel ajouté en présence de D500. La figure 11 présente l'intensité de recouvrement dans la zone photoblanchie déduite des images, chaque point correspondant à une image prise au temps indiqué. Dans le cas qui illustre la mesure ici, on recouvre 100 % de la fluorescence initiale, ce qui signifie que le traceur fluorescent est parfaitement mobile au sein de la matrice WPI dénaturée (qui est un gel à 120 g/L).

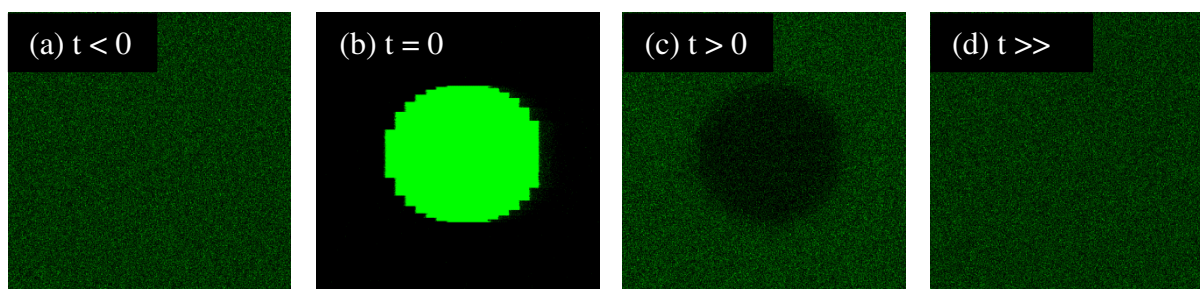


Figure 10 Visualisation des différentes étapes d'une expérience FRAP mise en place dans des gels de WPI ($C = 120$ g/l, chauffage à 80 °C pendant 24 h) en présence du traceur D500 sans sel ajouté à pH 7 (a) l'image avant photoblanchiment (b) l'image pendant le photoblanchiment (c) l'image prise toute de suite après le photoblanchiment (d) image prise 12 h après le photoblanchiment.

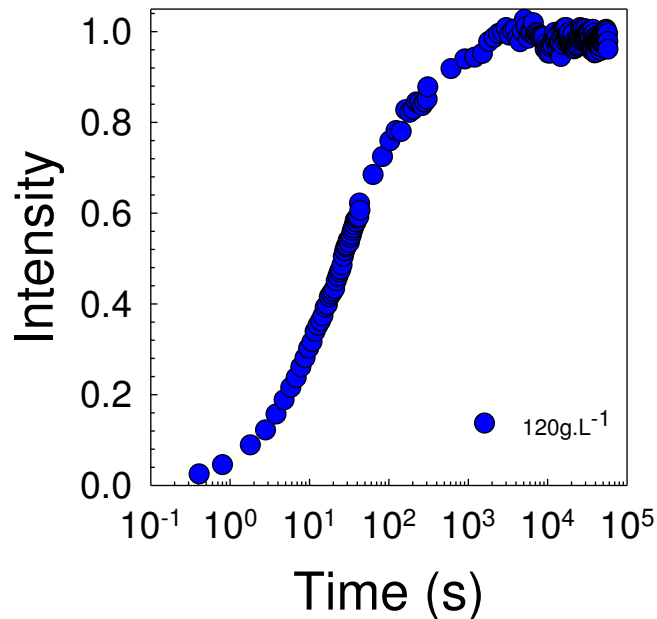


Figure 11 Intensité de recouvrement en fonction du temps après photoblanchiment pour le dextran (D500) dans un gel de WPI ($C = 120 \text{ g/L}$).

II.2.9.1.3. Analyse des expériences de FRAP

L'analyse des données a été réalisée avec un programme Matlab, le coefficient de diffusion des traceurs peut être calculé si la recouvrance d'intensité s'effectue selon un profil gaussien puisqu'alors la diffusion des traceurs procède selon un mécanisme Brownien. L'intensité de fluorescence de D500 dans les suspensions denses et dans les gels est illustrée sur les figures 12a et 12b respectivement en fonction de la distance au centre de la zone ROI jusqu'en dehors de la zone ROI avec différents temps de prise d'image après avoir photoblanchi les échantillons. On constate que dans la solution d'agrégats à 100 g/l , on recouvre à peu près l'état initial après 200 s mais pour les gels de WPI obtenus à $C = 150 \text{ g/L}$ l'intensité de recouvrement dans la zone de blanchiment n'atteint pas sa valeur initiale après $20\,000 \text{ s}$, ce qui signifie qu'une fraction de D500 est piégée dans le gel et ne peut accéder à la zone ROI.

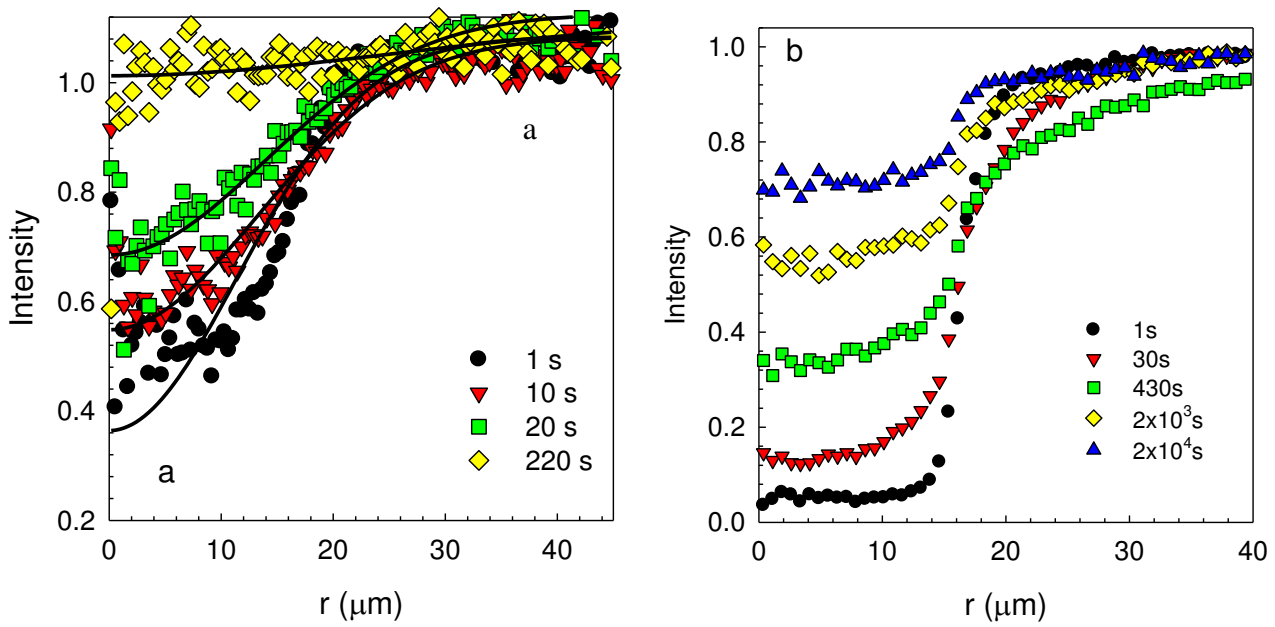


Figure 12 Profils d'intensité de fluorescence du D500 à partir du centre de la zone blanchie (ROI) jusqu'en dehors du ROI pour des agrégats fractals de WPI à 100 g/l (a) ou des gels de WPI à 150 g/l (b).

Chapitre III : Résultats et Discussions

III.1 Agrégats de protéines sériques

Les solutions natives de protéine sérique sont dénaturées par chauffage à une température supérieure à environ 80 °C. On souhaite disposer d'une librairie d'agrégats fractals de différente masse molaire et taille ainsi que de microgels. Pour ce faire, on va dénaturer différentes concentrations de WPI en fixant le pH à 7 en présence ou pas d'ions calcium. Dans le premier cas on forme des microgels, dans le second des agrégats fractals. On s'assure que le traitement thermique est suffisant pour que la conversion en protéines soit d'environ 100 %. On va à présent s'intéresser aux caractéristiques structurales des agrégats fractals en mesurant leur masse molaire et leur taille par diffusion de la lumière. Les mesures seront conduites sur les suspensions des agrégats à la concentration de préparation ainsi que sur des solutions très diluées de manière à s'affranchir des interactions. La même méthodologie sera appliquée pour la formation et la caractérisation d'agrégats de SPI (soy protein isolates).

III.1.1 Structure des agrégats et des gels fractals à la concentration de préparation

Différentes masses molaires et différentes tailles d'agrégats ont été préparées en chauffant des solutions de WPI natifs à différentes concentrations en protéines (C) de 10 g/L jusqu'à 200 g/L. La concentration de gélification (C_g) dans ces conditions est de 110 g/L. Les échantillons sont ensuite refroidis à température ambiante puis conservés à 4 °C. Les agrégats ont été caractérisés par diffusion statique et dynamique de la lumière (SLS et DLS) directement à leur concentration de préparation, (c'est-à-dire sans dilution préalable). Cela signifie donc qu'on ne peut s'affranchir des interactions et que les paramètres mesurés (masse molaire et rayon hydrodynamique) sont des grandeurs apparentes et non pas réelles (voir chapitre II.2.7). La figure 1a représente la masse molaire apparente (M_a) des agrégats de WPI en fonction du vecteur de diffusion pour différentes concentration de préparation. M_a montre une dépendance angulaire très faible quelle que soit la concentration de préparation ce qui signifie que le rayon de giration apparent (R_{ga}) des agrégats est petit (< 20 nm). Lorsque la concentration de préparation augmente M_a diminue ce qui est dû à des interactions répulsives de plus en plus intenses. Puisqu'on ne peut mesurer le rayon de giration apparent des agrégats de WPI, on a représenté la figure 1b la variation de leur rayon hydrodynamique apparent

(Rha) en fonction du vecteur de diffusion. Là encore, on ne mesure pas de dépendance angulaire de Ra ce qui s'explique par des valeurs faibles (confirmant la faible valeur de Rga), l'évolution de Rha avec la concentration suit la même tendance que celle de Ma.

La figure 2a représente la variation de Ma (moyennée sur toute la gamme de vecteur d'onde) en fonction de la concentration de préparation, la figure 2b correspond à la même représentation pour Rha. Ma diminue de façon exponentielle avec une augmentation de la concentration en protéines jusqu'à $C = 120 \text{ g/L}$ qui correspond grossièrement à la concentration de gélification, cette décroissance est causée par des interactions répulsives électrostatiques (car on rappelle qu'il n'y a pas de sel ajouté). Au dessus de 120 g/L , c'est-à-dire pour les gels, Ma est constante avec la concentration ce qui pourrait s'expliquer par le piégeage de fluctuations de concentration au sein des gels s'opposant à un ordre croissant induit par des répulsions électrostatiques (voir figure 2(a)). Il a été constaté qu'à partir de C_g une fraction croissante de la lumière diffusée fluctue très lentement. Cela est dû à une fraction croissante des fluctuations de concentration piégées et qui ne peuvent pas relaxer par diffusion coopérative des centres diffusants. La contribution des fluctuations de concentration piégées domine dans les gels et explique le fait que Ma ne diminue plus au dessus de C_g .

La dépendance de Rha avec la concentration suit les mêmes tendances que celles de la masse molaire : une décroissance exponentielle de 20 à 5 nm avec la concentration jusqu'à C_g puis une valeur plateau. L'étude de Ra a été limitée en concentration car il apparaît un mode lent qui est difficilement séparable du mode rapide par analyse des fonctions de corrélation.

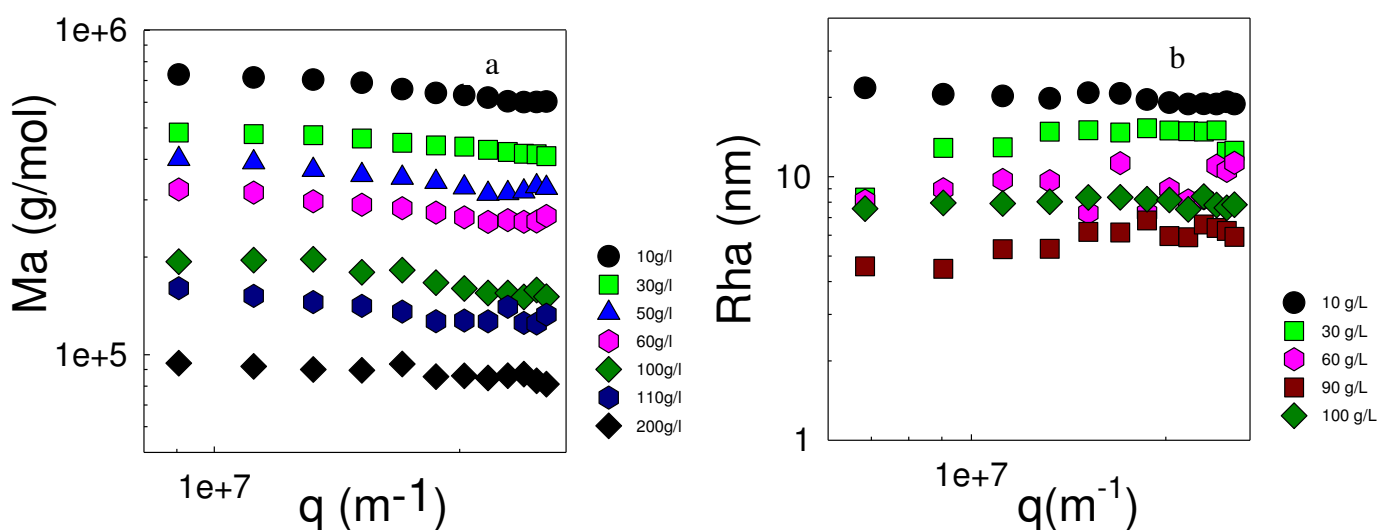


Figure 1 Masse molaire (a) et rayon hydrodynamique (b) apparents pour des suspensions et des gels de WPI en fonction du vecteur de diffusion.

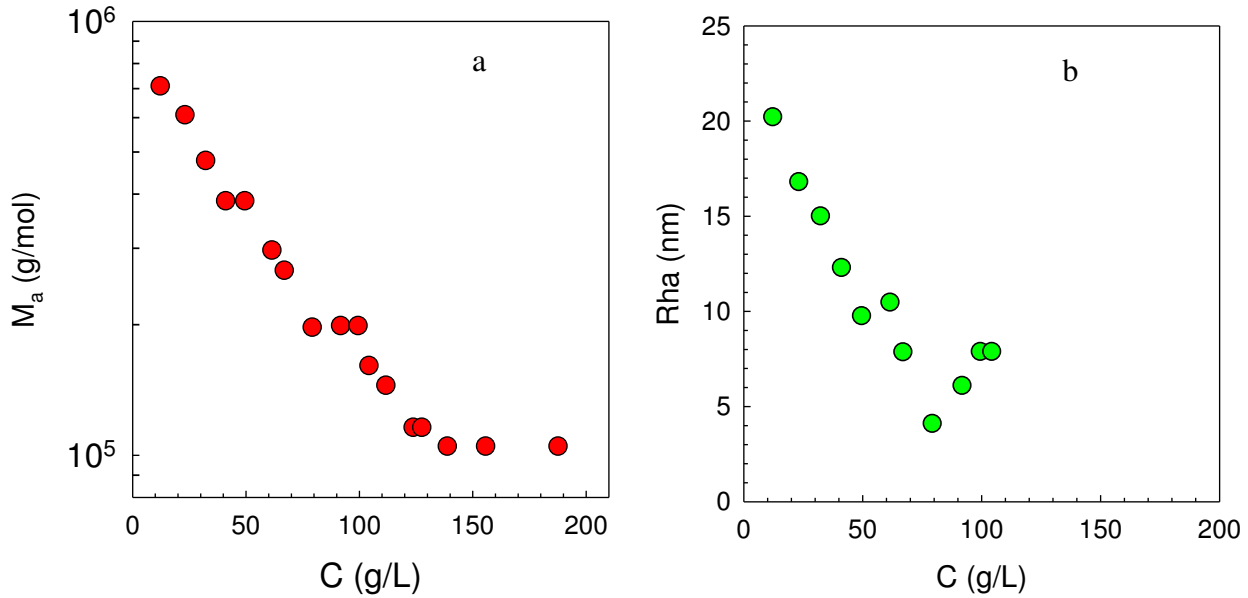


Figure 2 Masse molaire (a) et rayon hydrodynamique (b) apparents pour des suspensions et des gels de WPI en fonction de la concentration à laquelle ils ont été préparés par dénaturation thermique.

A présent, pour s'affranchir de l'effet des interactions, les mêmes échantillons (sauf les gels) sont dilués à une concentration inférieure à 1 g/L.

III.1.2 Structure des agrégats fractals en milieu dilué

Comme les interactions peuvent être à présent négligées, c'est la masse molaire vraie des agrégats à leur concentration de préparation qui est mesurée. De même on mesure le coefficient de diffusion vrai (D) des agrégats.

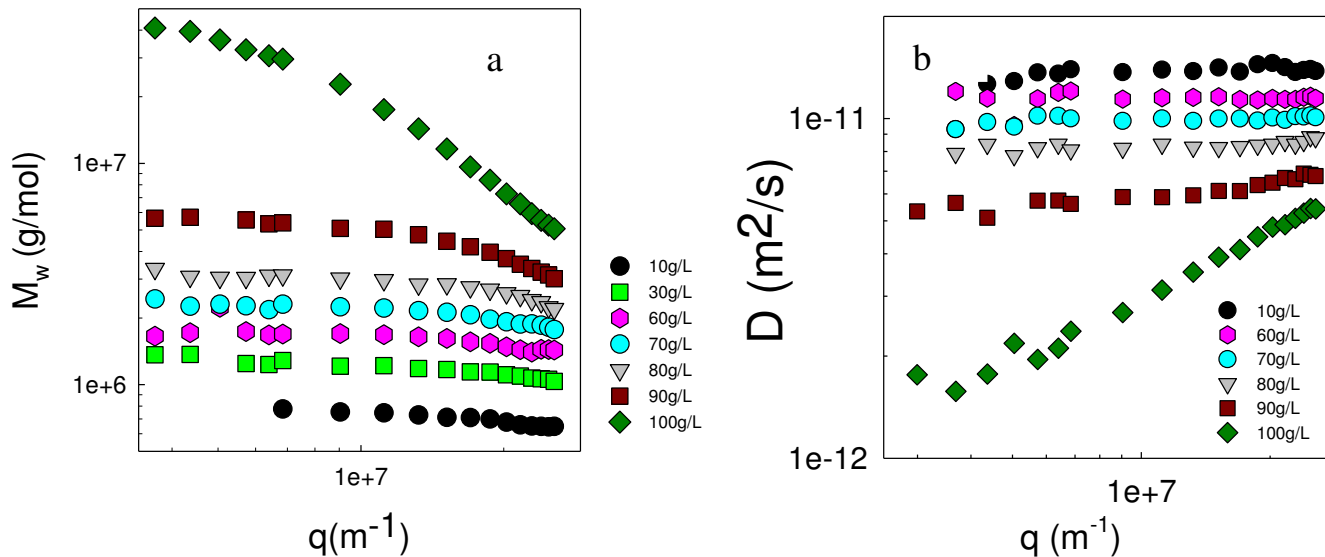


Figure 3 Dépendances angulaire de la masse molaire (3a) et du coefficient de diffusion (3b) vrais des agrégats de WPI formés par chauffage à différentes concentrations en protéines indiquées.

La figure 3a représente la masse molaire vraie des agrégats en fonction du vecteur de diffusion pour différentes concentration de préparation. Aux faibles concentrations, M_w ne présente pas de dépendance angulaire car les agrégats sont petits. A mesure que la concentration de préparation augmente, M_w augmente et présente une dépendance angulaire plus marquée car la taille et la masse molaire des agrégats augmentent. On ne peut pas analyser des concentrations de préparations au dessus de 100 g/L car on forme alors des gels qu'on ne peut pas diluer. La figure 3b représente la variation du coefficient de diffusion vrai des agrégats en fonction du vecteur de diffusion à différente concentration de préparation. Aux faibles valeurs de cette dernière, comme les agrégats sont petits, D ne présente pas de dépendance angulaire. Pour les agrégats de taille croissante (obtenus en augmentant la

concentration de préparation), D montre une dépendance angulaire logiquement plus marquée et diminue en valeur car la taille des agrégats augmente.

Pour chaque concentration de préparation, on peut extrapoler M_w et D à angle nul (ou les moyenner sur toute la gamme d'angle quand il n'y a pas de dépendance angulaire). La dépendance angulaire de M_w permet d'estimer le rayon de giration des agrégats. Aux plus fortes concentrations, les distributions de taille et de masse molaire des agrégats sont polydisperses et varient selon une loi de puissance avec q sur toute la gamme angulaire. Dans ce cas, la mesure des tailles et des masses molaires n'est plus possible (voir figure 3a à 100 g/L où l'on ne voit pas de plateau aux petites valeurs de q). Ces valeurs pour les agrégats fractals formés à haute concentration en protéine sont obtenues en prenant pour références les données obtenues à plus faible concentration. En normalisant les résultats de la courbe 3a par la masse molaire des agrégats pour l'axe des ordonnées et par le rayon de giration pour l'axe des abscisses, on obtient une courbe maîtresse (voir la figure 4a) qui représente le facteur de structure des agrégats ($S(q)$). Un ajustement des données avec l'équation $S(q) = 1 - \frac{q^2 R_g^2}{3}$ est possible (voir ligne continue sur la figure 4a).

Les données de diffusion dynamique de la lumière peuvent être traitées de la même manière. Le spectre des temps de relaxation est cependant rapidement dominé par le pic des agrégats qui se déplace vers des temps de relaxation plus longs avec un temps de chauffage croissant. Le coefficient de diffusion est une moyenne en z et pour les agrégats les plus grands (obtenus à 100 g/L) présente une dépendance en loi puissance sur toute la gamme de q (voir la figure 4b). Comme pour la statique, l'ensemble des données de diffusion dynamique de la lumière, après renormalisation, forment une courbe maîtresse traduisant l'auto-similarité de la structure des agrégats.

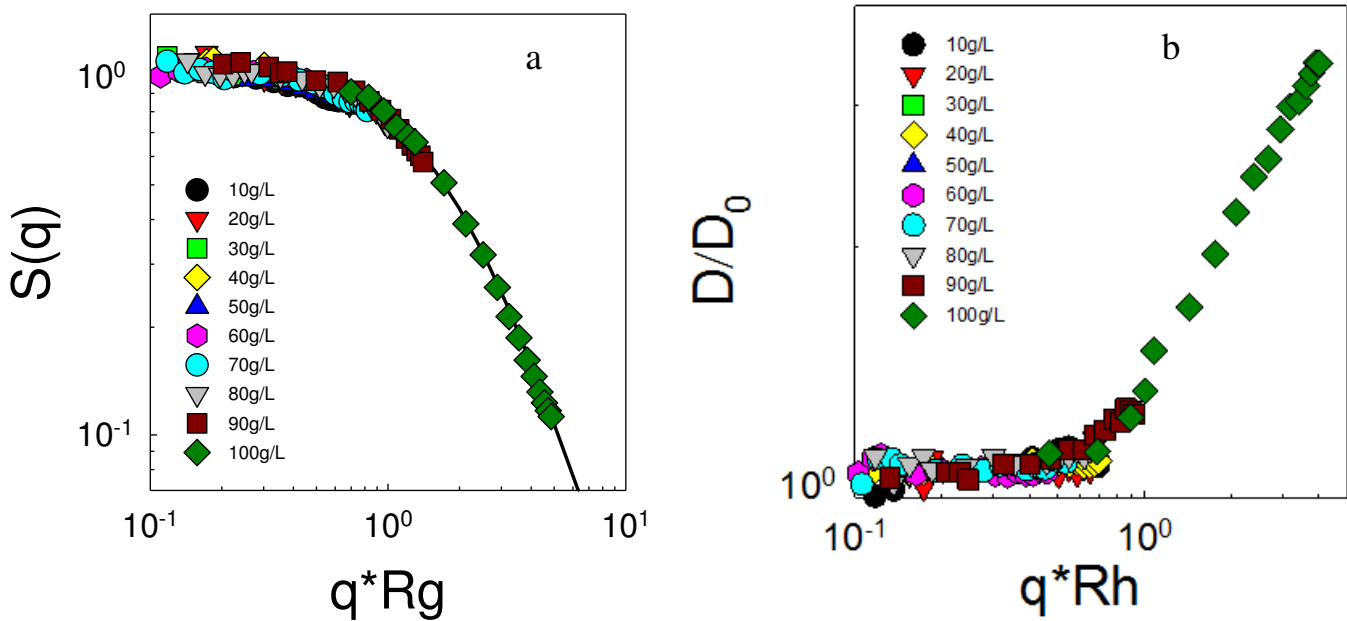


Figure 4 (a) facteur de structure des agrégats obtenu par la normalisation de R_{θ}/KC par M_w et de q par R_g . La ligne continue correspond à un ajustement mathématique des données (voir l'équation 12 dans la chapitre II). (b) courbe maîtresse des données de diffusion dynamique de la lumière obtenue en normalisant D par la valeur de D à $q = 0$ et le vecteur de diffusion par R_h .

On a représenté sur la figure 5 la masse molaire et les rayons des agrégats en fonction de leur concentration de préparation. Au dessous d'environ 60 g/L, la masse molaire et la taille des agrégats augmentent un peu avec la concentration de préparation. Au dessus de 60 g/L cette augmentation est plus rapide car on s'approche de la concentration de gélification où ces grandeurs doivent diverger. La figure 6 représente la variation de la masse molaire des agrégats en fonction de leurs tailles. Dans les deux cas, M_w varie comme une loi de puissance de la taille avec un exposant égal à 1,7 qui représente la dimension fractale des agrégats. Toutefois, R_h est systématiquement plus petit que R_g d'environ un facteur 0,7 car les moyennes en z de ses grandeurs ne sont pas impactées de la même façon par la polydispersité de la distribution de taille des agrégats.

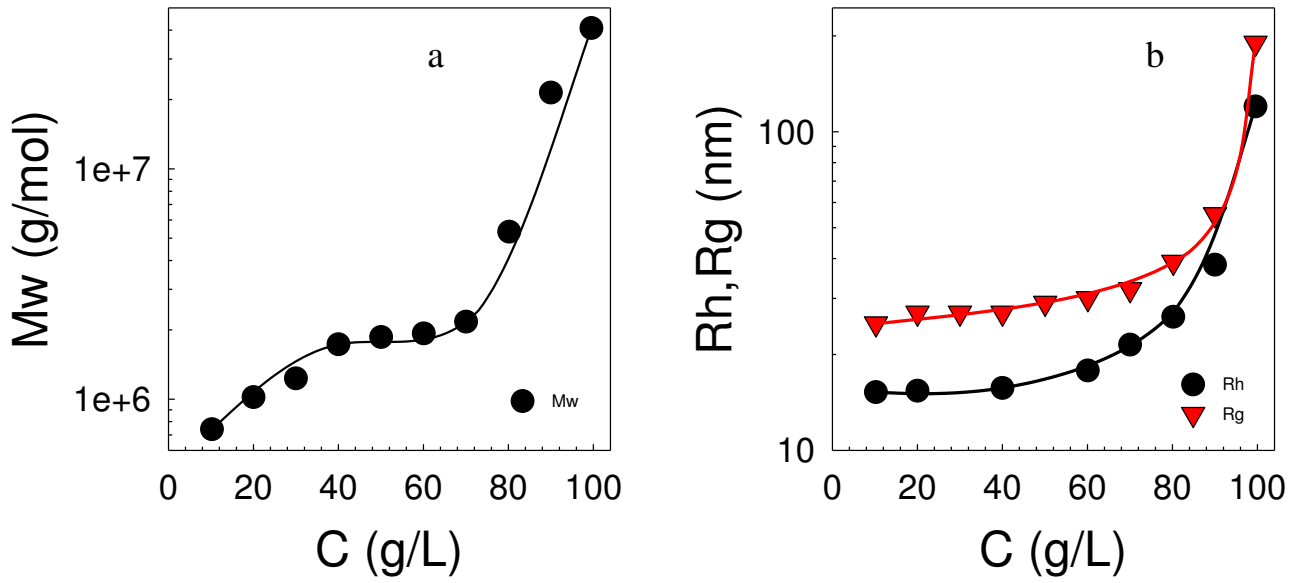


Figure 5 Masse molaire des agrégats (a), rayons de giration et hydrodynamique (b) en fonction de la concentration de préparation en protéine les lignes continues sont des guides pour les yeux.

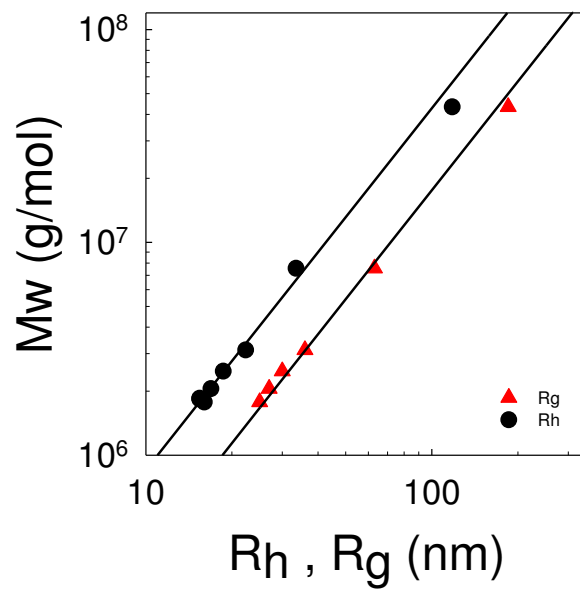


Figure 6 Masse molaire des agrégats en fonction de Rh et Rg les lignes continues correspondent à $df = 1,7$.

En conclusion, lorsqu'on prépare des agrégats de WPI par chauffage à $\text{pH} = 7$ et à $80\text{ }^\circ\text{C}$ de différentes concentrations en protéines, on peut fabriquer des agrégats de taille et masse molaire croissante avec la concentration de préparation jusqu'à 110 g/L on l'on obtient des gels. Ces agrégats sont autosimilaires et ont une dimension fractale de 1,7.

III.1.2.1 Structure de suspensions d'agrégats fractal de taille fixe : influence de la concentration

On fabrique des agrégats de taille variable entre 16 et 117 nm en chauffant des solutions de protéines aux concentrations correspondantes. Ensuite pour une taille donnée, on regarde l'influence de la concentration sur les propriétés structurales des suspensions d'agrégats sur une large gamme de concentration (10^{-2} à 96 g/L). Pour ce faire, les suspensions des agrégats les plus petits ont été ultrafiltrées pour les reconcentrer. On s'est assuré que cette étape de reconcentration n'induisait pas une agrégation ultérieure des suspensions (voir le chapitre II).

On a étudié la structure de suspensions d'agrégats de taille fixe par diffusion de la lumière, la figure 7a illustre pour des agrégats de $R_h = 117\text{ nm}$, la dépendance angulaire de l'intensité diffusée (R_θ/KC) en fonction de la concentration. Aux plus petites concentrations et à petites valeurs de q , R_θ/KC est égal à M_w (voir la partie II.2.7) car les interactions peuvent être négligées. On constate que quand la concentration augmente la dépendance angulaire de l'intensité diffusée diminue ce qui signifie que la longueur de corrélation des solutions concentrées est inférieure à 15 nm. Pour chaque concentration, on peut extrapoler la valeur de l'intensité diffusée à angle nul et en déduire alors la masse molaire apparente (M_a) des solutions.

M_a est représentée en fonction de la concentration pour différentes tailles d'agrégats fractals sur la courbe 7b. Aux plus faibles concentrations M_a est égale à la masse molaire vraie des agrégats qui augmentent logiquement avec leur taille. Pour une taille d'agrégat donnée, M_a diminue quand on augmente la concentration en raison des interactions électrostatiques et de volume exclu entre les agrégats. Quelle que soit la taille des agrégats, aux plus fortes concentrations, M_a est identique car les agrégats sont fortement interpénétrés. De plus, la compressibilité osmotique ($dC/d\pi$) qui varie comme M_a est déterminée principalement par les

interactions entre les unités constitutives des agrégats qui à cette échelle sont identiques quelle que soit la taille des agrégats.

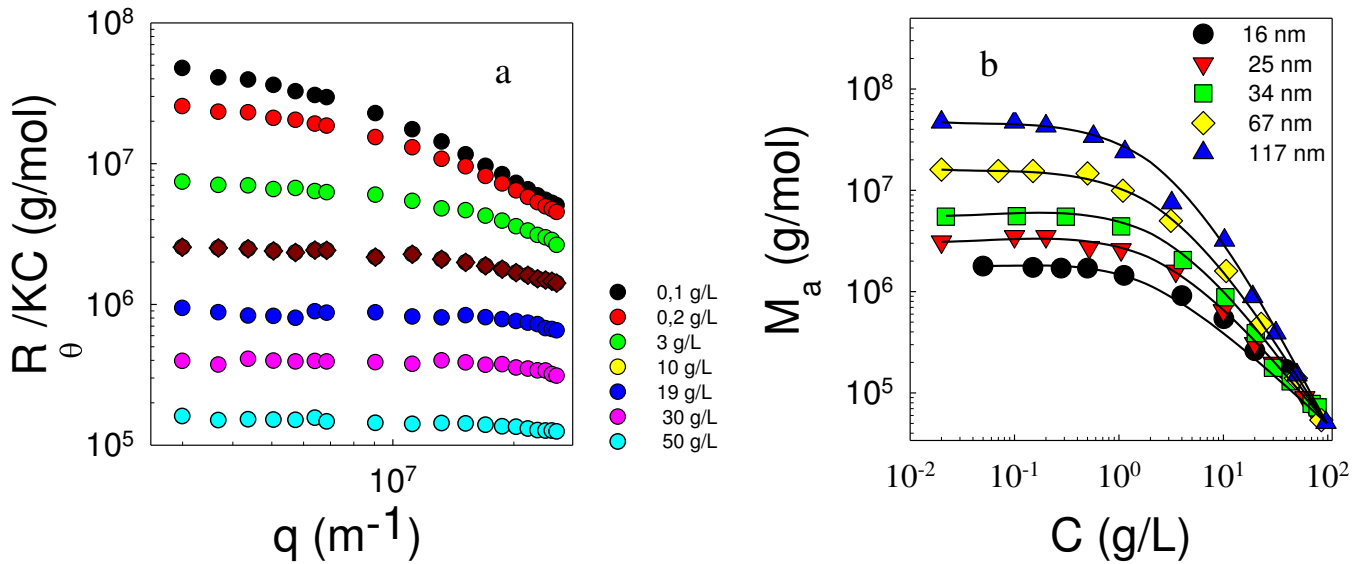


Figure 7 (a) dépendance angulaire de R_{θ}/KC pour des agrégats de taille 117 nm formés par chauffage à $C = 96$ g/L puis dilués à différentes concentrations comme indiqué sur la figure. (b) Masse molaire apparente en fonction de la concentration pour des agrégats de différentes tailles indiquées sur la figure les lignes continues sont des guides pour les yeux.

III.1.2.2 Viscosité des suspensions d'agrégats

On s'intéresse à la viscosité de suspensions d'agrégats, ici il s'agit de la viscosité newtonienne c'est-à-dire indépendante du taux de cisaillement (voir la partie II.2.8). Dans un premier temps on représente la viscosité de suspensions d'agrégats en fonction de leur concentration de préparation (voir la figure 8). On constate que la viscosité initialement peut dépendre de la concentration de préparation augmente plus fortement quand on s'approche de la concentration de gélification et diverge (comme la masse molaire et les rayons des agrégats).

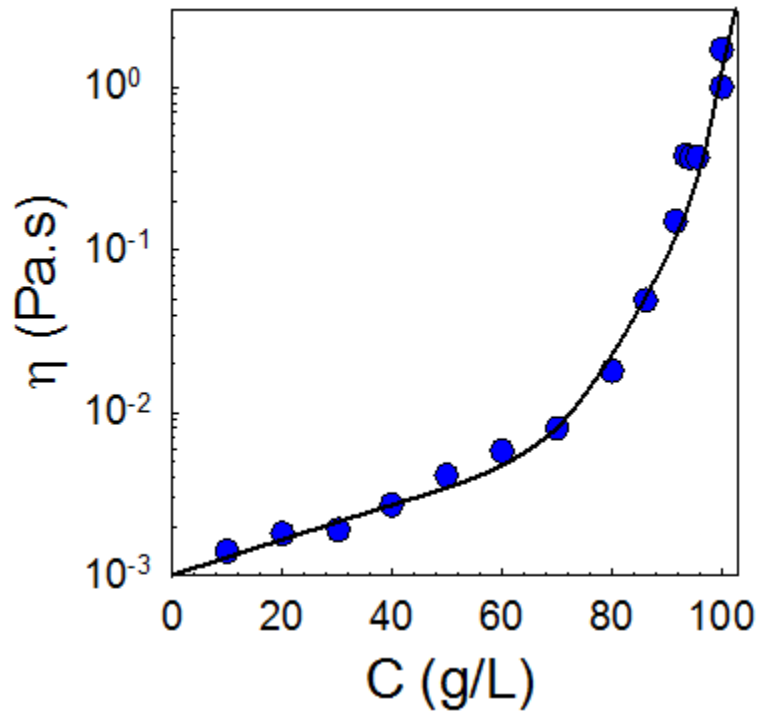


Figure 8 Suspension d'agrégats de WPI en fonction de la concentration, la ligne continue est un guide pour les yeux.

Le comportement des suspensions d'agrégats de taille fixe en fonction de la concentration est différent (voir la figure 9a). En effet, la viscosité varie de manière exponentielle avec la concentration sur toute la gamme de concentration explorée pour les agrégats les plus petits. Pour des agrégats plus gros, la croissance exponentielle de la viscosité est suivie d'une augmentation plus rapide voire d'une gélification. Cette transition s'effectue à une concentration caractéristique (C_c) qui diminue quand la taille des agrégats augmente. Il convient de dire qu'aux plus fortes concentrations, la viscosité peut augmenter dans le temps mais l'effet reste négligeable sur les deux premiers jours.

En normalisant l'axe des concentrations par la valeur de la concentration caractéristique C_c , l'ensemble des résultats conduit à une courbe maîtresse excepté aux plus fortes concentrations où la dépendance de la viscosité n'a plus une variation exponentielle avec la concentration (la figure 9b). On peut ainsi prédire la viscosité de suspensions d'agrégats de taille connue quelle que soit leur concentration (si celle dernière reste au moins plus faible que $3C_c$).

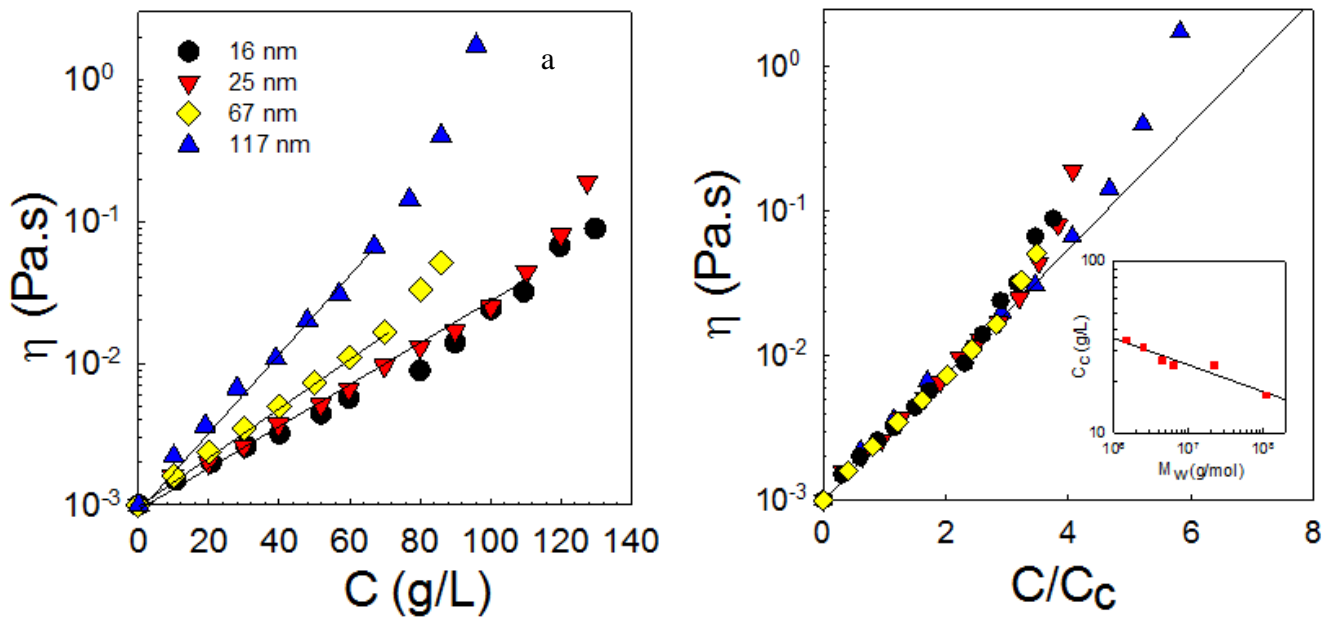


Figure 9 (a) dépendance de la viscosité à cisaillement nul avec la concentration en protéine pour des agrégats de différentes tailles les lignes continues sont les guides pour les yeux. (b) Courbe maîtresse des résultats montrés sur la figure 9a obtenue en divisant C par C_c . La ligne pleine représente $\eta = \eta_s \cdot \exp(C/C_c)$. La dépendance de C_c avec M_w est montrée dans l'encart.

III.1.3 Structure et Viscosité de microgels de WPI

Des microgels de WPI ont été formés en chauffant des solutions de WPI natifs à $C = 40$ g/L en présence d'une petite quantité de CaCl_2 (4,5 mM). La masse molaire des microgels a été mesurée par diffusion de la lumière et vaut $1,1 \times 10^9$ g/mol, les tailles sont $R_h = 116$ nm et $R_g = 160$ nm. La solution de microgels a été concentrée par ultrafiltration jusqu'à $C = 125$ g/L sans modification de leurs tailles et de leur masse molaire (voir la figure 10a).

La structure des suspensions concentrées de microgels n'a pas pu être étudiée par diffusion de lumière en raison de leur turbidité trop importante.

La figure 10b montre la dépendance de la viscosité des microgels en fonction de leur concentration, si on compare avec la viscosité des agrégats fractals dont le R_h est proche de

celui des microgels, on constate que la viscosité des suspensions d'agrégats fractals augmente plus fortement avec la concentration que celle des microgels. Cela est dû à la densité plus importante des microgels par rapport aux agrégats fractals.

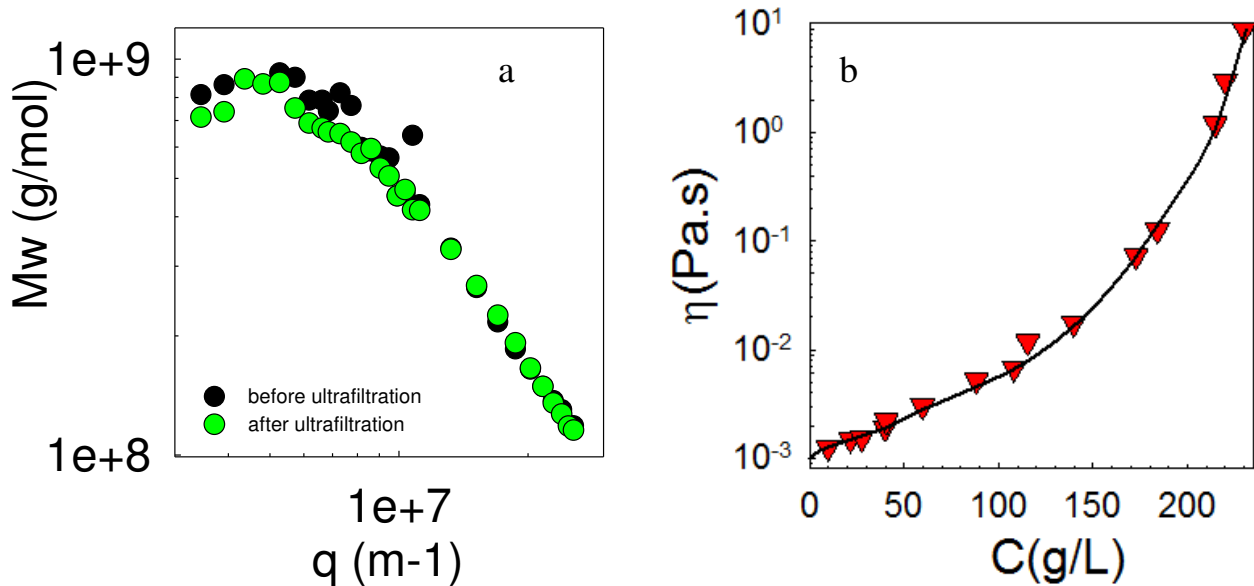


Figure 10 (a) variation de la masse molaire des microgels de WPI en fonction du vecteur de diffusion avant et après concentration par l'ultrafiltration, les solutions ont été diluées à 0.5 g/L pour s'affranchir des interactions. (b) viscosité des suspensions microgels en fonction de la concentration en protéine.

III.2 Structure et viscosité d'agrégats d'isolats de protéines de soja (SPI).

Les solutions de SPI ont été chauffées à 80 °C pendant 2 h à pH 7, la concentration critique de gélification a été observée visuellement à $C = 75$ g/L. Les solutions d'agrégats ont été ensuite diluées à une concentration en protéine inférieure à 1 g/L pour que l'effet des interactions soit négligeable sur la mesure de la taille (R_h , R_g) et de la masse molaire (M_w) de ces agrégats par diffusion de la lumière.

La dépendance angulaire de la masse molaire en fonction du vecteur de diffusion pour des agrégats préparés à différentes concentrations en protéines est montrée sur la figure 11a. La

masse molaire et sa dépendance angulaire augmentent avec la concentration en protéine. Comme pour le WPI, cela signifie que la concentration initiale en protéine influence la taille et la masse molaire des agrégats obtenus par dénaturation thermique. La figure 11b montre que le coefficient de diffusion diminue quand la concentration augmente et devient de plus en plus dépendant de q quand les agrégats sont de plus en plus grands de la même manière que pour le WPI. Les valeurs de D extrapolées à $q = 0$ représentent le coefficient d'autodiffusion des agrégats (D_0) et peuvent être utilisées pour calculer leur rayon hydrodynamique (R_h). La taille et la masse molaire des agrégats de SPI en fonction de la concentration de préparation sont représentées sur la figure 12, les trois grandeurs divergent lorsqu'on approche la concentration de gélification (C_g) du SPI. Pour les agrégats les plus grands (c'est-à-dire préparés aux plus fortes concentrations) la mesure de la masse molaire et des tailles n'est pas toujours possible car les extrapolations à angle nul sont difficiles, c'est pourquoi on a recours aux courbes maîtresses du facteur de structure $S(q)=f(qR_g)$ et $D/D_0=f(qR_h)$ en prenant une concentration de préparation comme référence (voir la figure 14). Les agrégats obtenus par dénaturation thermique du SPI sont donc auto-similaires et fractals comme ceux de WPI. Il existe néanmoins une différence entre les deux types d'agrégats qui provient de la dimension fractale. La figure 13 qui représente la variation de la masse molaire en fonction de R_g et R_h permet de déduire $D_f = 2$. Les agrégats de SPI sont donc plus compacts que ceux de WPI ($D_f = 1,7$).

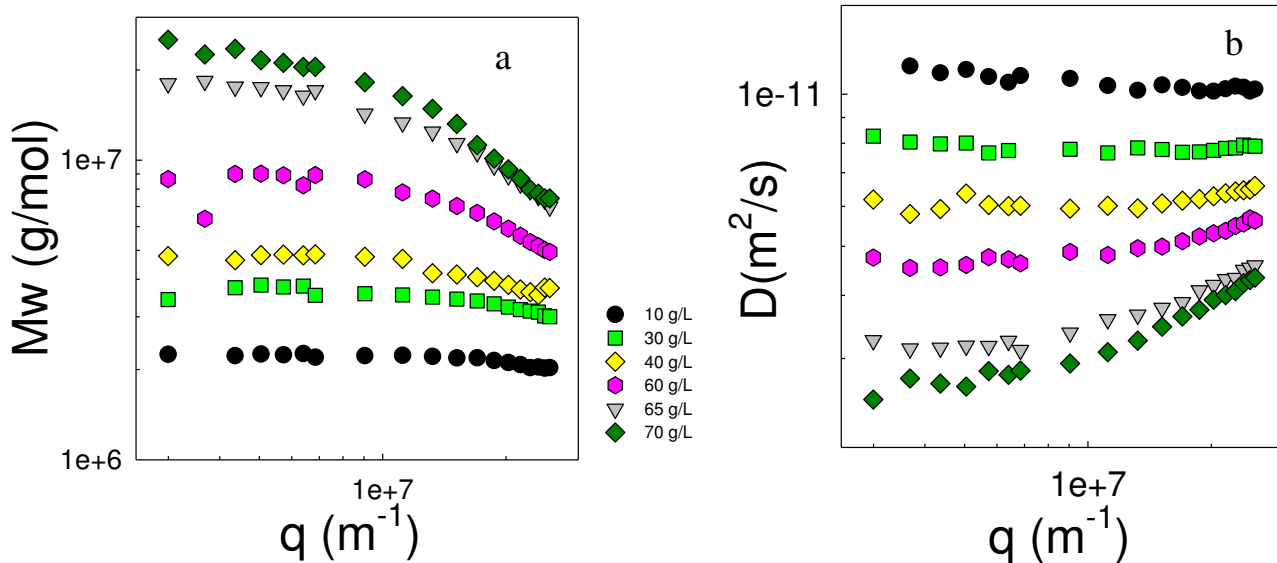


Figure 11 (a) dépendances avec le vecteur de diffusion de la masse molaire (a) et du coefficient de diffusion (b) d'agrégats de SPI formés par chauffage à 80 °C pendant 2 h à différentes concentrations en protéines comme indiqué dans la figure.

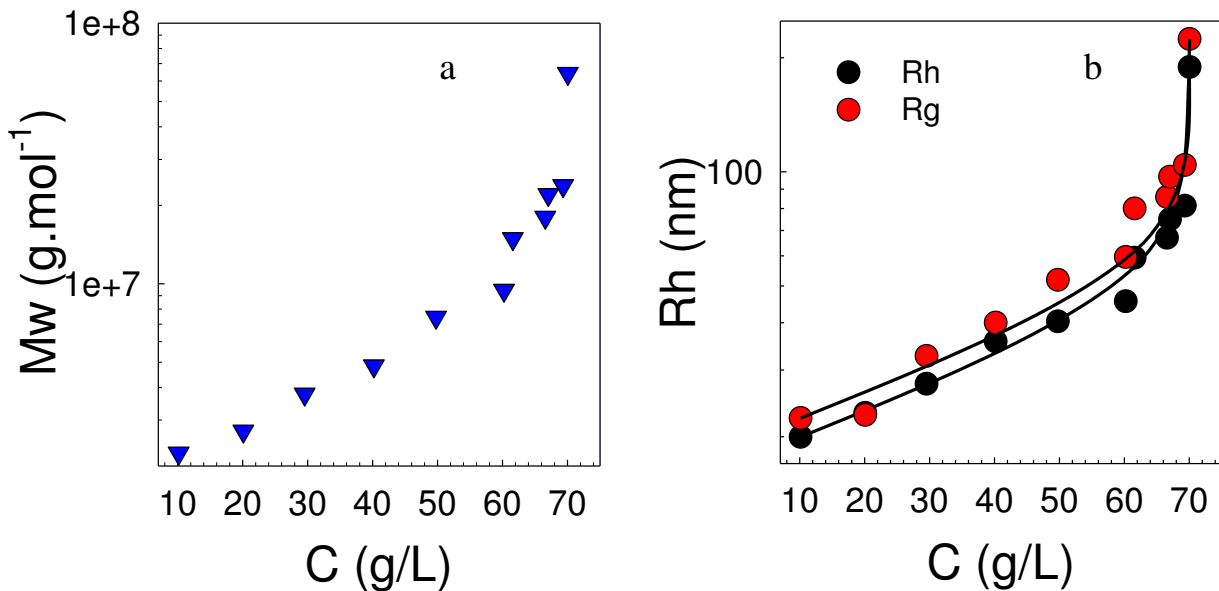


Figure 12 Dépendance avec la concentration de préparation de la masse molaire (a), des rayons de giration et hydrodynamique (b) d'agrégats de SPI obtenus par chauffage à 80 °C pendant 2 h les lignes continues sont des guides pour les yeux.

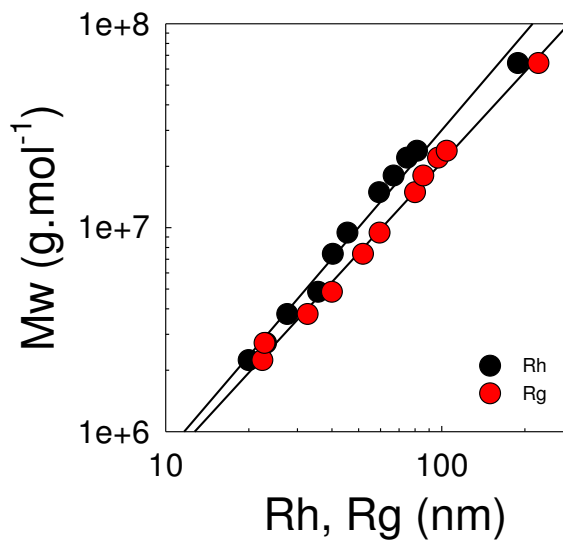


Figure 13 Masse molaire moyenne en masse des agrégats de SPI en fonction de R_h et R_g les lignes continues correspondent à $df = 2$.

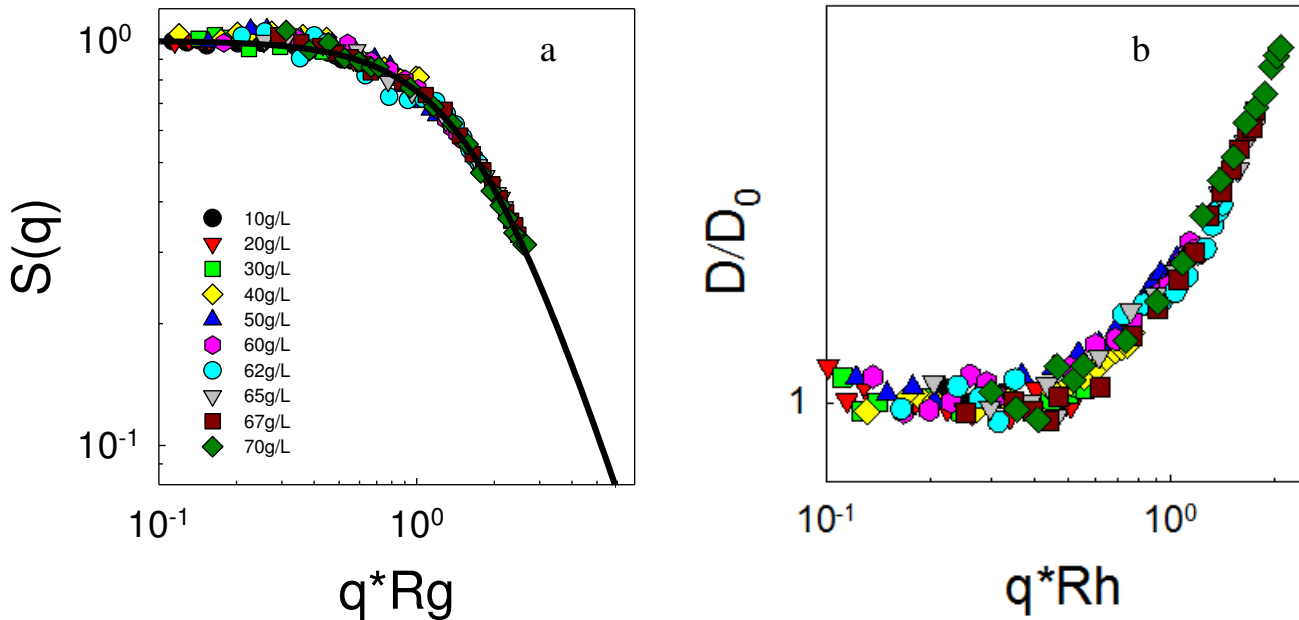


Figure 14 (a) facteur de structure des agrégats de SPI les lignes continues correspondent à l'équation numéro 12 dans la chapitre II (b) normalisation de D par sa valeur à $q = 0$.

La structure des agrégats SPI formés par chauffage est très similaire à celle des agrégats de WPI formés par dénaturation thermique à pH neutre. Dans les deux cas, les agrégats présentent une structure auto-similaire avec une dimension fractale proche de 2, mais le mécanisme détaillé du processus de dénaturation et de la formation des liens est différent pour chaque type de protéine.

La viscosité des agrégats de SPI a été mesurée en fonction de leur concentration de préparation et est représentée sur la figure 15. Comme pour les agrégats de WPI, la viscosité augmente avec la masse molaire et la taille des agrégats et va jusqu'à diverger à la concentration de gélification (75 g/L). Cette concentration est plus faible que pour le WPI car les agrégats de SPI à une concentration identique à celle du WPI sont plus grands et basés sur des protéines qui ont une masse molaire plus importante que celles du WPI.

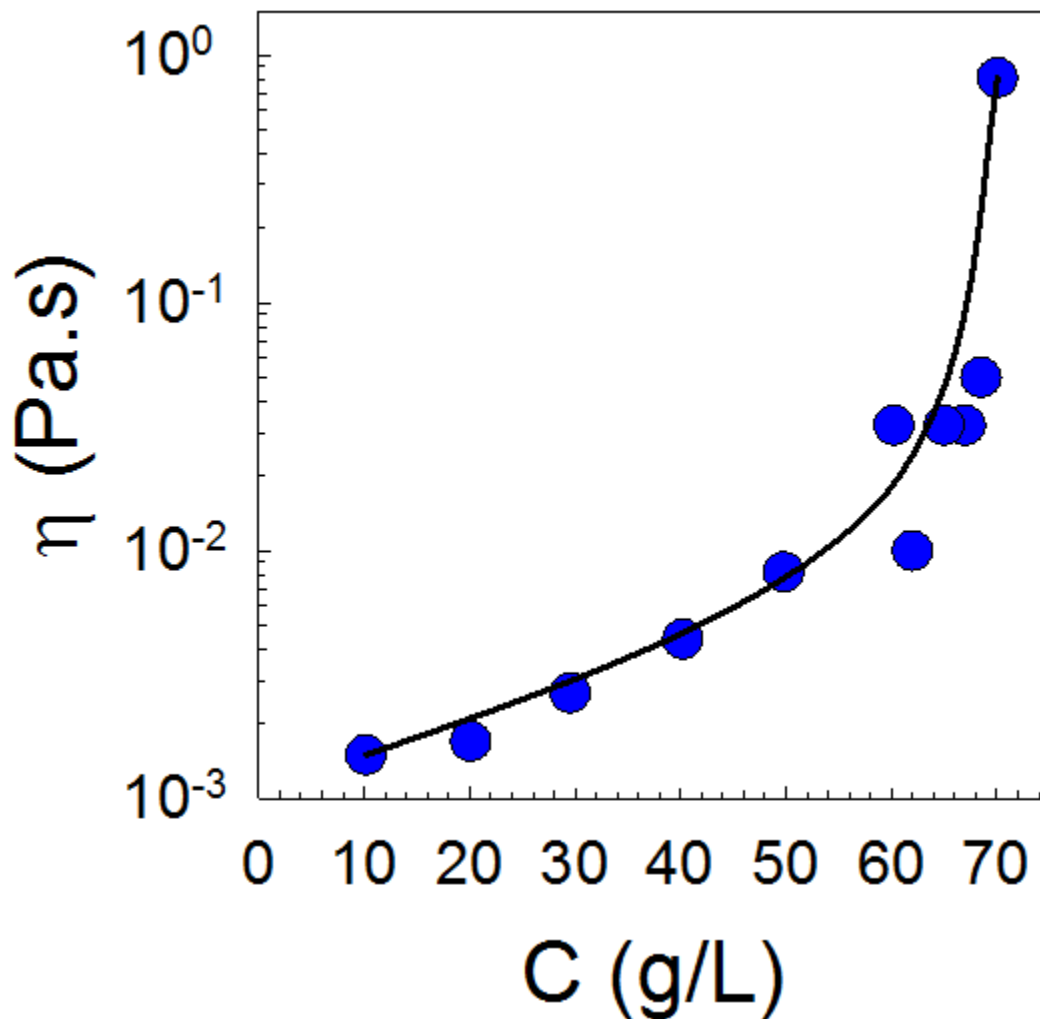


Figure 15 Viscosité des agrégats SPI en fonction de leur concentration de préparation la ligne continue est un guide pour les yeux.

On dispose à présent de différents types d'agrégats de protéines :

- Des agrégats fractals de WPI de taille variable entre 16 et 117 nm.
- Des microgels de WPI de taille égale à 116 nm.
- Des agrégats fractals de SPI de taille variable entre 20 et 180 nm.

Pour tous ces systèmes on a établi les propriétés structurales et dynamiques. A présent, on va procéder à leur mélange : agrégats fractals de WPI de différentes tailles, agrégats fractals et microgels de WPI et agrégats fractals de WPI et de SPI. De la même manière que pour les

composants pris individuellement, on va s'intéresser aux conséquences des mélanges sur leurs propriétés structurales et leur viscosité.

III.3 Mélanges d'agrégats fractals de différentes tailles

Le comportement de mélanges d'agrégats fractals de WPI de deux tailles différentes a été étudié. Dans l'eau, de petits agrégats protéiques "monodisperses" ont été formés à $C < 50$ g/L (les agrégats ont alors une taille de 16 nm). Ces agrégats sont les sous-unités des agrégats fractals qui sont formés à des concentrations plus élevées. Les solutions de ces agrégats fractals sont transparentes parce que des agrégats plus petits sont incorporés dans les agrégats de plus grandes tailles. L'interpénétration des agrégats fractals explique la structure des suspensions denses qui est indépendante de leur taille comme montré auparavant. Le comportement des agrégats fractals flexibles est très différent de celui des agrégats rigides parce qu'ils peuvent s'interpénétrer cela signifie que la viscosité de tels systèmes ne peut pas être interprétée en termes de fraction volumique des agrégats. La taille, la masse molaire et la viscosité de mélanges d'agrégats fractals de WPI (16 nm et 117 nm) ont été mesurées à différentes concentrations par les techniques de diffusion de la lumière et de rhéologie en fixant la composition massique des mélanges.

La structure de mélanges d'agrégats fractals de taille 117 et 16 nm a été étudiée à différents rapports massique w_{117}/w_{16} (10/90 ; 25/75 ; 50/50 et 80/20). Les résultats des mélanges sont présentés sur la figure 16 et comparés avec le comportement des ingrédients seuls.

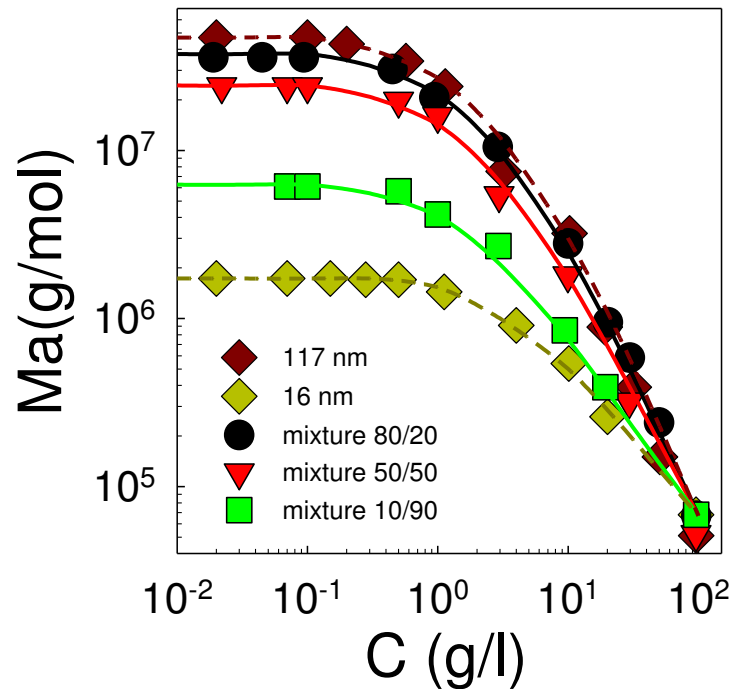


Figure 16 Dépendance en concentration de la masse molaire apparente (a) et de la viscosité (b) de mélanges d'agrégats de WPI de taille 117 et 16 nm à différents rapports indiqués dans les figures, les lignes continues représentent les résultats prédits pour une loi de mélange et les lignes discontinues représentent le guides pour les yeux.

A faible concentration ($C < 1$ g/L), on observe que la masse molaire apparente des mélanges est proportionnelle à la somme pondérée par la composition des masses molaires des petits et grands agrégats fractals. A partir de $C > 10$ g/L, des interactions répulsives entre les petits et les grands agrégats fractals sont observées ce qui conduit comme pour les ingrédients pris seuls à une diminution de Ma . Aux plus fortes concentrations, de nouveau, Ma qui varie comme la compressibilité osmotique est identique pour les mélanges et les ingrédients seuls car on sonde dans ce régime de concentration les unités constitutives élémentaires qui sont toutes les mêmes quels que soient les agrégats. Néanmoins, la petite différence qu'on observe entre les agrégats de taille 16 nm et les autres courbes peut s'expliquer par une polydispersité plus faible et une structure plus linéaire des petits agrégats.

Les mêmes mélanges ont été étudiés par rhéologie et la figure 17a représente leur viscosité à taux de cisaillement nul pour différents rapports massiques, les résultats sont comparés avec

le comportement des ingrédients pris seuls. Lorsque la fraction en grands agrégats fractals diminue, la viscosité s'approche de plus en plus de celle des petits agrégats.

A une concentration de 100 g/L pour un mélange, on a représenté la variation de la viscosité en fonction de la proportion en agrégats de taille 117 nm (voir la figure 17a). On constate qu'il y a une loi de mélange de type logarithmique sur toute la gamme de composition et l'on peut ainsi écrire :

$$\log(\eta_{mélange}) = \omega_{117}\log(\eta_{117}) + (1 - \omega_{117})\log(\eta_{16}). \quad \text{Eq.25}$$

Si on applique une telle loi de mélange aux autres concentrations en fixant le ratio massique w_{117}/w_{16} , on peut alors essayer de prédire la viscosité des mélanges quelle que soit leur composition. Cette prédiction est représentée par les lignes continues dans la figure 17b. On constate un assez bon accord entre les résultats expérimentaux et la prédiction.

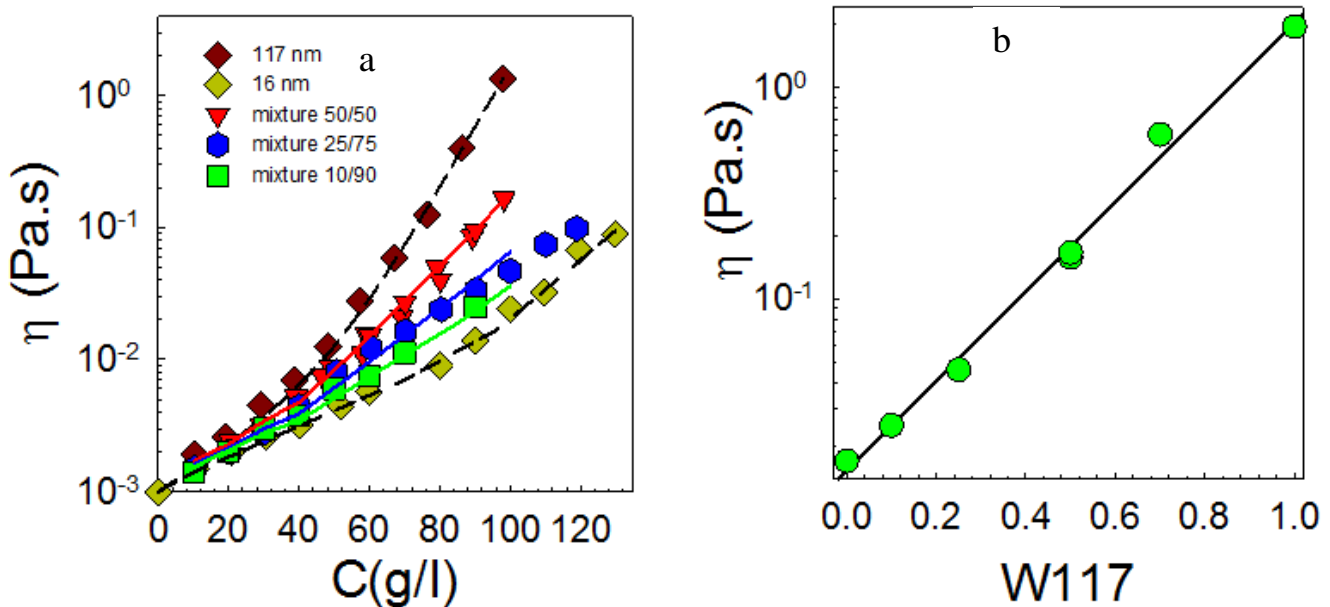


Figure 17 (a) dépendance avec la concentration de la viscosité de mélanges d'agrégats de WPI de 117 nm et 16 nm à différents rapports massique 50/50, 25/75 et 10/90. Les lignes continues représentent les résultats prédits pour une loi de mélange de type logarithmique (b). Influence du ratio massique des agrégats fractals de WPI de 117 nm sur la viscosité des mélanges avec des agrégats fractals de 16 nm à 100 g/L.

III.4 Mélanges d'agrégats fractals et de microgels de WPI

On mélange des agrégats fractals ($C_f = 100$ g/L) et des microgels ($C_a = 100$ g/L) de taille identique (117 et 116 nm) respectivement avec un rapport massique 50/50. Ensuite ce mélange est dilué ou concentré par ultrafiltration pour couvrir une gamme de concentration s'étendant de 10 à 125 g/L en fixant le rapport 50/50.

La figure 18a représente la viscosité en fonction du taux de cisaillement pour les mélanges à différentes concentrations totales en protéines. Aux plus faibles concentrations, les mélanges peuvent être considérés comme newtoniens puisque la viscosité est indépendante du taux de cisaillement. Quand la concentration en protéines augmente, les mélanges sont rhéofluidifiants aux taux de cisaillement les plus élevés. La figure 18b montre la courbe maîtresse des mêmes données obtenues par décalages horizontaux et verticaux en prenant le mélange à 80 g/L comme référence. Cette courbe maîtresse permet de s'affranchir de l'artefact des mesures aux plus faibles taux de cisaillement et ainsi de déterminer la viscosité newtonienne des mélanges sur toute la gamme de concentrations étudiée.

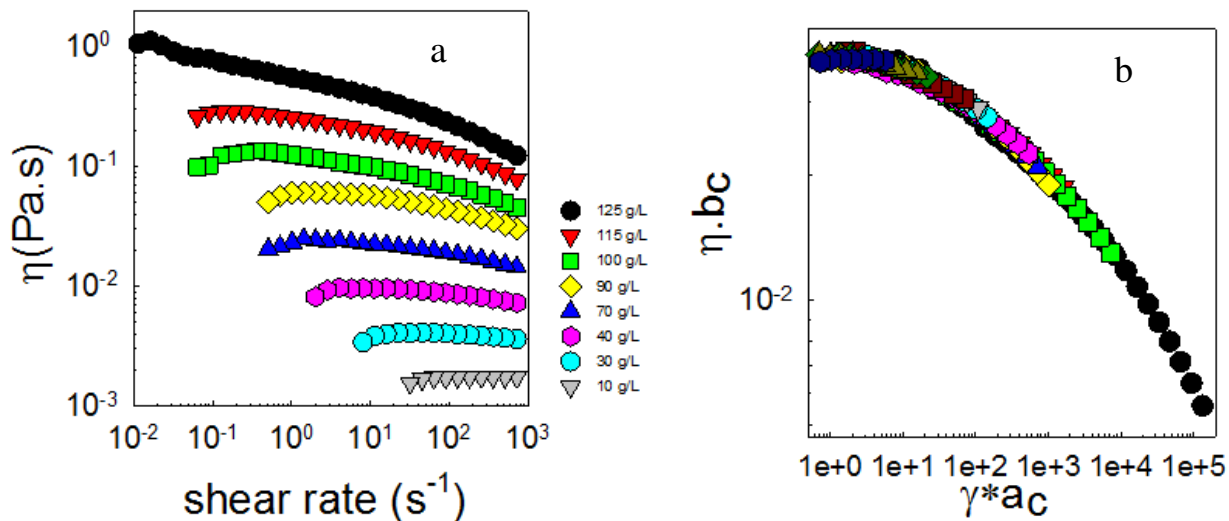


Figure 18 (a) viscosité en fonction d taux de cisaillement pour des mélanges d'agrégats fractals et de microgels dans le rapport 50/50 à différentes concentrations en protéines. Les

agrégats fractals et les microgels ont une taille respective de 117 et 116 nm. (b) courbe maîtresse des mêmes données en utilisant comme référence les données obtenues à 80 g/L.

La figure 19 représente la variation de la viscosité des mélanges à un rapport fixe 50/50 en fonction de la concentration en protéines. Les mélanges sont comparés avec chacun des ingrédients pris séparément. On constate que la viscosité des mélanges est fortement dominée par la contribution des agrégats fractals en raison de leur plus faible densité à taille identique à celle des microgels.

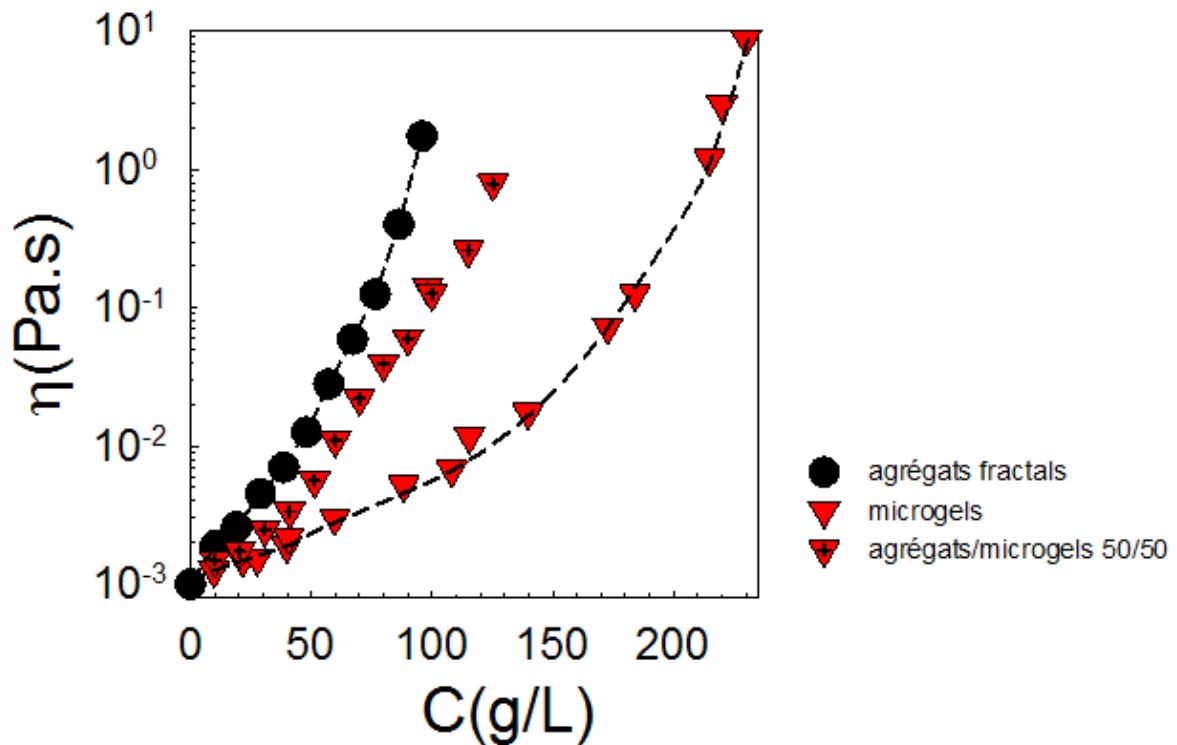


Figure 19 Viscosité newtonienne en fonction de la concentration en protéine de mélanges d'agrégats fractals (117 nm) et de microgels (116 nm) au ratio 50/50 les lignes discontinues sont des guides pour les yeux.

III.5 Mélange d'agrégats fractals de WPI et de SPI

Un mélange entre des agrégats fractals de WPI formés par chauffage à $C = 100$ g/L (117 nm) et d'agrégats de SPI formés par chauffage à $C = 70$ g/L (180 nm) est réalisée à un rapport massique 50/50 à une concentration totale en protéines de 70 g/L. Ce mélange est ensuite dilué pour couvrir une gamme de concentration s'étendant de 0,1 à 70 g/L. Les mélanges sont réalisés à température ambiante et conservés dans un endroit frais.

La figure 20a représente la dépendance en concentration de la masse molaire apparente des mélanges, les résultats sont comparés avec ceux des ingrédients pris séparément. Il convient de dire que l'incrément d'indice de réfraction du WPI et du SPI est le même. Les agrégats de WPI et de SPI ont respectivement une masse molaire de $2.9 \cdot 10^7$ et $5.2 \cdot 10^7$ g/mol. Aux plus faibles concentrations, la masse molaire mesurée correspond à la moyenne des masses molaires de chacun des ingrédients pondérées par la composition. Quand on augmente la concentration, la masse molaire apparente diminue du fait d'interactions répulsives. Il faut remarquer que dans le cas des mélanges aux plus fortes concentrations, les interactions entre les agrégats de WPI et de SPI sont différentes de celles des agrégats pris séparément. Pour les mélanges les valeurs de M_a et donc la compressibilité osmotique sont plus élevées que pour les ingrédients pris séparément ce qui signifie que les interactions WPI/SPI sont moins répulsives, néanmoins cette plus grande attractivité entre le SPI et le WPI ne conduit pas à un phénomène de microséparation de phase. En effet, les mélanges se présentent sous la forme de solutions homogènes stables.

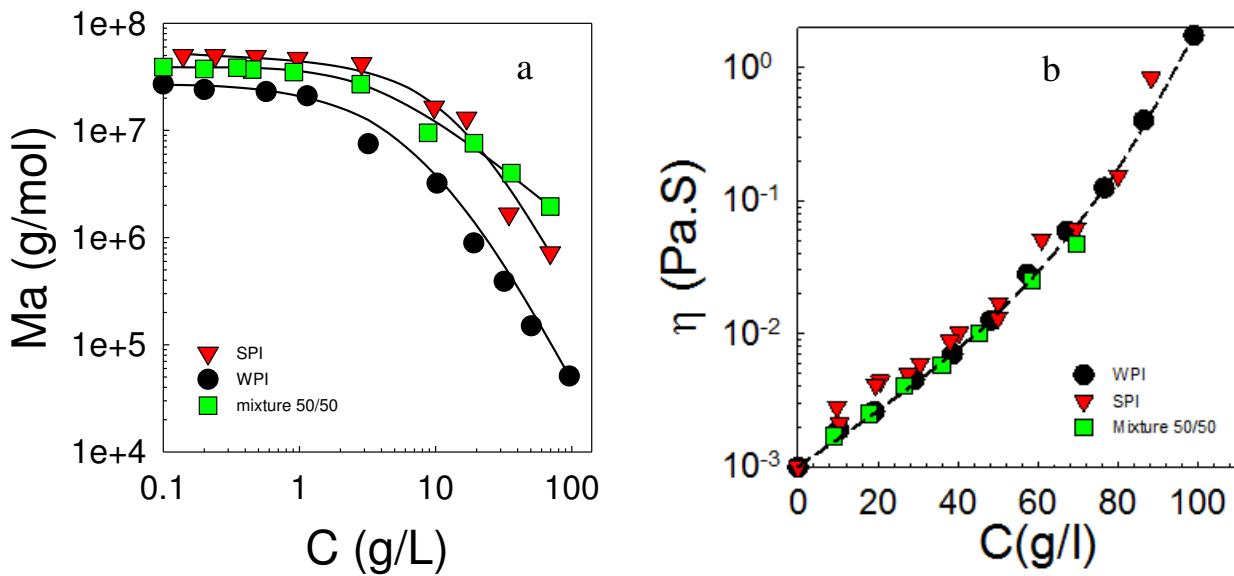


Figure 20 Dépendance en concentration de la masse molaire apparente, les lignes continues sont des guides pour les yeux (a) et de la viscosité (b) de mélanges d'agrégats de WPI et de SPI à un rapport massique 50/50, la ligne discontinue est le guide pour les yeux.

La figure 20b représente la variation de la viscosité du mélange 50/50 d'agrégats de WPI et de SPI, les résultats sont comparés avec ceux des ingrédients pris séparément. En pratique la viscosité des agrégats de SPI varie comme celle des agrégats de WPI en fonction de la concentration car les objets ont une masse molaire et une taille à peu près identiques. De ce fait lorsqu'on mélange les deux types d'agrégats, la viscosité des mélanges est du même ordre de grandeur que celle des ingrédients pris séparément néanmoins, les interactions à l'œuvre comme vu en diffusion de la lumière sont plus attractives dans le cas des mélanges ce qui ne semble pas avoir un effet trop important sur la viscosité.

III.6 Mobilité de traceurs polymères dans les suspensions denses d'agrégats et dans les gels de protéines sériques

La diffusion de chaînes de poly(oxyde d'éthylène) ou de dextran a été rapportée pour des gels de β -lactoglobuline et de WPI. Comme attendu, leur coefficient de diffusion par rapport à celui mesuré dans l'eau diminue quand la concentration en protéines augmente et quand la taille des traceurs polymères est plus grande. Ces derniers diffusent plus lentement dans les gels que dans les solutions de protéines natives (à concentration identique) sauf dans des gels formés à forte force ionique en raison de leurs hétérogénéités structurales. Pour des gels homogènes (formés dans l'eau pure), une fraction importante des traceurs polymères devient extrêmement lente. Ici on va mesurer la diffusion de chaînes de dextran marquées dans des suspensions d'agrégats de WPI et dans des gels. On rappelle qu'en pratique les traceurs sont ajoutés soit dans les solutions de protéines natives qui sont ensuite chauffées in situ soit directement dans les suspensions des agrégats pré-formés.

La Figure 21 représente des profils d'intensité de fluorescence mesurés après différent temps après le photoblanchiment d'une zone de rayon = 15 μm . Ces résultats résument ce qui est rencontré pour des suspensions (ici on a représenté $C = 30 \text{ g/L}$) ou des gels ($C = 150 \text{ g/L}$) de WPI.

Pour les suspensions, le profil qui est initialement carré tend rapidement vers un profil gaussien, ce qui est attendu pour une diffusion Brownienne des traceurs. A contrario, pour les gels, le profil carré persiste mais son amplitude décroît avec le temps ce qui correspond à ce qui a été rapporté dans la littérature.

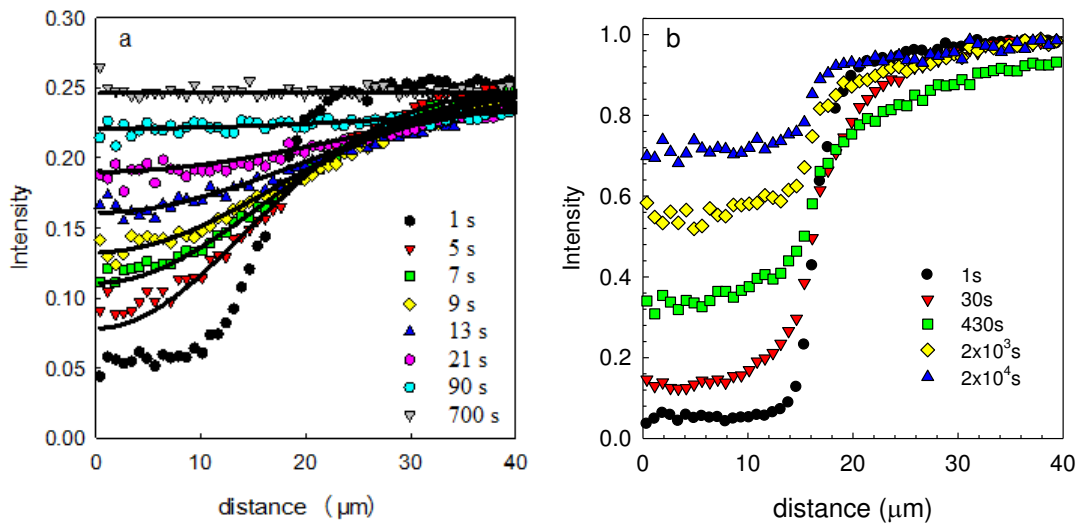


Figure 21 Profils d'intensité de fluorescence mesurés pour D500 à 30 (a) et 150 g/L (b) de WPI. Les lignes continues correspondent à un ajustement des données avec un profil gaussien.

Pour les systèmes qui présentent des profils gaussiens (donc jusqu'à $C = 120$ g/L), on a déterminé le coefficient de diffusion (D) en analysant la dépendance temporelle de l'intensité de tous les pixels de l'image avec le logiciel Matlab. La dépendance en concentration D , après normalisation par sa valeur mesurée dans l'eau (D_0) est représentée figure 22a pour les solutions natives et dénaturées thermiquement de WPI. D_r diminue avec la concentration, ce qui est attendu. On note que pour les solutions dénaturées, cette diminution est plus importante car la taille et la masse molaire des protéines ont augmenté ce qui entraîne une friction plus grande entre les chaînes de dextran et les agrégats par rapport aux protéines natives plus petites. On peut comparer la dépendance en concentration de D_r avec celle de la viscosité pour les solutions dénaturées thermiquement (la figure 22b) qui ne coïncident pas, ce qui signifie la mobilité des chaînes de dextran n'est pas le seul résultat de la viscosité du milieu. Le problème c'est qu'on a ici à la fois une variation de la taille et de la concentration des agrégats et il est difficile de discriminer la contribution de chacun de ces phénomènes.

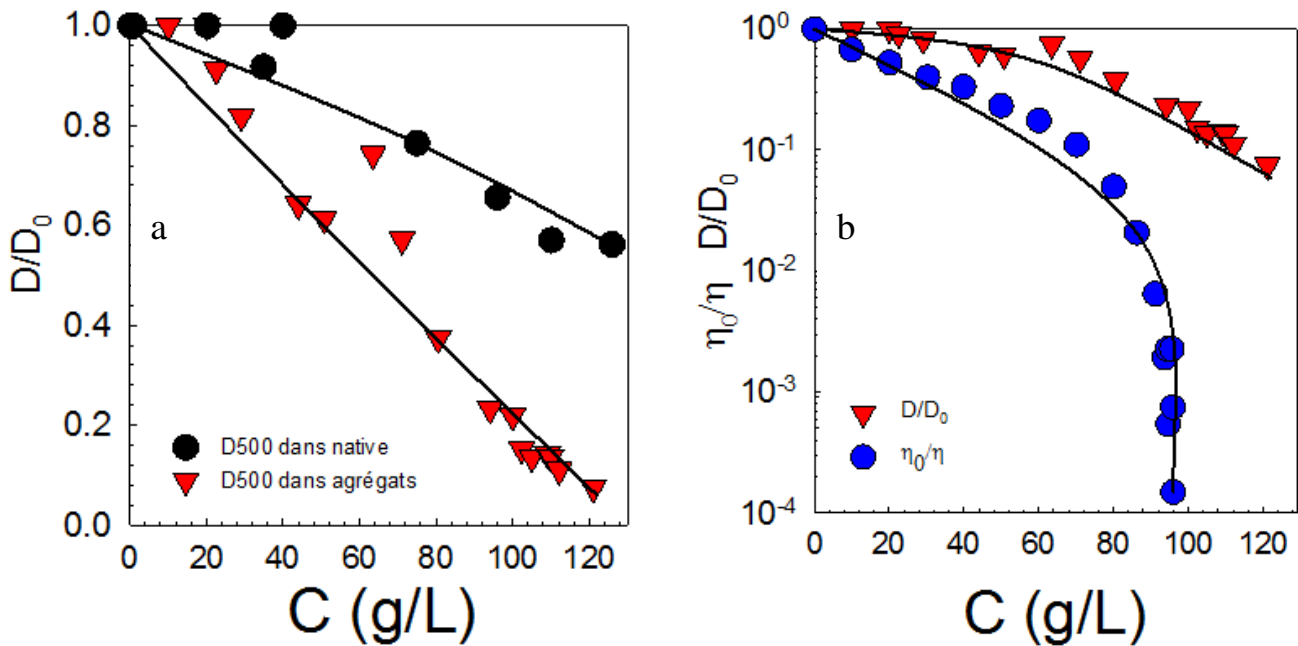


Figure 22 D/D_0 pour D500 dans des suspensions de WPI natif et des agrégats fractals formés par chauffage, les lignes continues sont des guides pour les yeux (a) et comparaison de D/D_0 et de η_0/η des suspensions dénaturées en fonction de la concentration en protéine, les lignes continues sont des guides pour les yeux (b).

III.6.1 Influence de la taille et de la structure des agrégats.

On fixe à présent la taille des agrégats (petits ou grands) et leur structure (fractals ou microgels) et on étudie la diffusion de chaînes de D500 au sein des suspensions. La figure 23 compare le rapport D/D_0 mesuré dans les suspensions natives de WPI avec sa valeur dans les suspensions de petits et grands agrégats fractals et dans des microgels. Le rapport D/D_0 est beaucoup plus faible dans les suspensions de grands agrégats fractals que dans les suspensions de WPI natif, ce qui est attendu et est intermédiaire pour les suspensions de petits agrégats fractals. Cela indique que le frein à la mobilité du dextran et qui correspond aux mouvements des protéines agrégées ou pas qui agissent comme autant d'obstacles est très dépendant de leurs dimensions. La viscosité des suspensions des protéines est également le reflet de la mobilité des protéines, pourtant elle évolue de manière très différente avec la concentration (voir la figure 22b). Le dextran ne voit donc pas les suspensions comme un milieu continu.

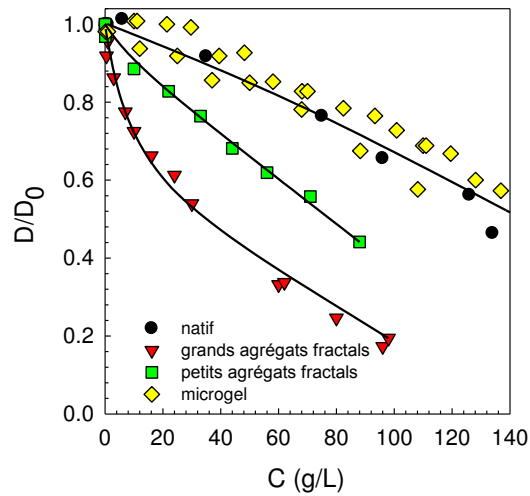


Figure 23 D/D_0 de D500 dans des suspensions de WPI natif, de petits (16 nm) et grands (117 nm) agrégats fractals et de microgels, les lignes continues sont des guides pour les yeux.

La mobilité du dextran dans les suspensions de microgels est identique à celle dans les protéines natives et beaucoup plus rapide que dans les suspensions d'agrégats fractals de taille identique à celle des microgels. Les microgels sont des particules denses, de ce fait leur concentration critique de recouvrement est d'environ 300 g/L (contre 11 g/L pour les agrégats fractals de taille identique). Sur la gamme de concentration étudiée ici, les microgels sont en solution diluée et les chaînes de dextran libres en leur sein. Tandis que pour les agrégats fractals de même taille, les chaînes de dextran doivent diffuser à l'intérieur des fractals (par reptation) pour pouvoir bouger. Pour les microgels, le nombre d'obstacle et leur mobilité sont plus petits que pour les fractals mais les deux effets semblent se compenser pour conduire à une mobilité du dextran identique à celle mesurée dans les solutions de protéines natives, il faudrait réaliser des mesures à plus haute concentration en microgels pour commencer à voir une différence.

III.6.2 Influence de la taille du traceur

La figure 24 représente D/D_0 pour deux dextrans (D500 et D70) dispersés dans de petits (16 nm) et de grands (117 nm) agrégats fractals. Pour les petits fractals, il n'y a pas d'influence de la taille du traceur sur sa mobilité ce qui est très différent de ce qui est obtenu pour les grands agrégats fractals. Comme indiqué auparavant, la mobilité du dextran est liée à celle des agrégats qui agissent comme autant d'obstacle. La friction du traceur dépendrait de sa taille pour les petits agrégats fractals, ce qui pour nos deux dextrans conduit à peu près à la même chose car leur différence de taille est modérée. Dans les suspensions de gros agrégats, les traceurs doivent pouvoir bouger entre (et au sein) d'obstacles qui se meuvent plus difficilement quand ils sont gros ce qui est plus difficile pour le D500 que pour le D70.

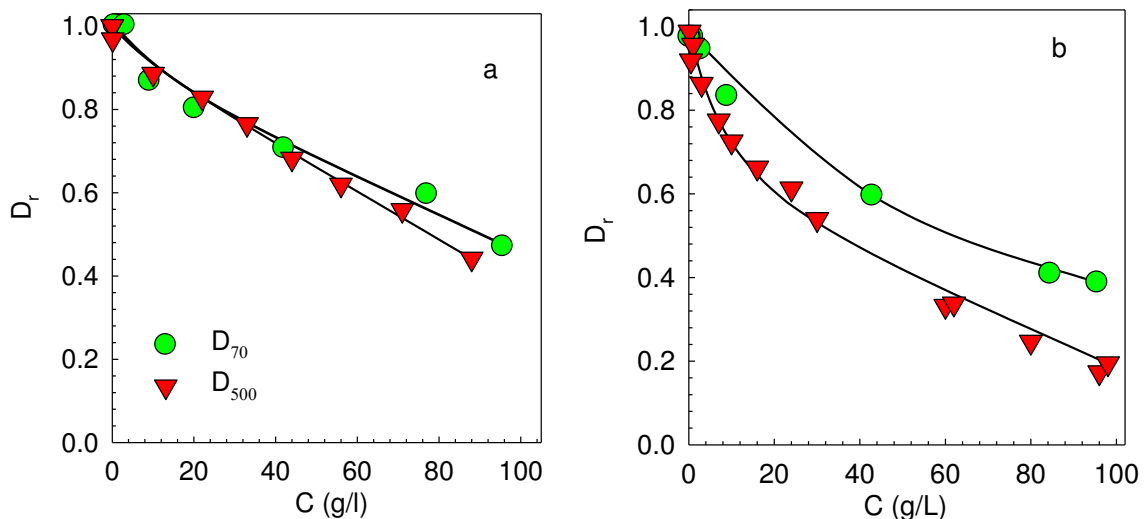


Figure 24 Dépendance en concentration du coefficient de diffusion normalisé par D_0 pour le D70 et le D500 au sein de suspensions de petits (a) ou grands (b) agrégats fractals, les lignes continues sont des guides pour les yeux.

Conclusion

La diffusion de traceurs au sein de suspensions d'agrégats de protéines de WPI dépend de leur taille, de leur structure et de leur concentration. La diffusion est plus rapide dans des

suspensions de petits plutôt que grands agrégats fractals parce ces derniers obstacles bougent plus difficilement. La diffusion des traceurs est plus facile dans des suspensions de microgels (et plus facile que dans des suspensions de petits agrégats fractals) car les microgels sont plus denses et occupent moins de volume à concentration en protéine identique.

La dépendance à la concentration des traceurs est plus faible que celle de la viscosité des suspensions ce qui indique que les suspensions ne constituent pas un milieu continu à l'échelle de taille des traceurs.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Des agrégats fractals de WPI sont formés en chauffant les protéines globulaires en solution aqueuse à pH 7. La taille moyenne des agrégats augmente avec la concentration à laquelle les protéines sont chauffées diverge à la concentration de gel critique. Pour une taille d'agrégat donnée, la viscosité augmente exponentiellement avec la concentration en protéines. L'augmentation de viscosité a lieu à des concentrations plus faibles si les agrégats fractals sont plus grands. Cependant l'effet de la taille doit être conjugué à celui de la dispersion en taille des agrégats qui sont polydispersés, les petits agrégats étant inclus dans les grands. La compressibilité osmotique et la longueur de corrélation diminuent avec l'augmentation de la concentration et sont indépendantes de la taille des agrégats fractals à des concentrations élevées.

Le comportement de microgels formés en chauffant les protéines globulaires en présence d'une petite quantité de CaCl_2 est différent de celui des agrégats fractals, car ils sont plus denses et ne peuvent pas s'interpénétrer. Par conséquent l'augmentation de la viscosité des solutions de microgel avec la concentration en protéines est plus faible et ne dépend pas de la taille des microgels.

Le comportement de suspensions denses des mélanges de petits et grands agrégats fractals a été étudié. Les mélanges sont macroscopiquement transparents parce que les petits agrégats qui sont les unités élémentaires de l'agrégat fractal sont intégrées de manière homogène dans les mélanges.

Le mélange entre des agrégats fractals et des microgels qui ont la même taille est turbide en raison des derniers. La viscosité des mélanges varie de façon exponentielle entre les deux viscosités des deux ingrédients pris séparément (tout comme pour les mélanges d'agrégats fractals de différentes tailles).

Le chauffage d'isolats de protéine de soja (SPI) à pH neutre conduit à la formation d'agrégats auto-similaires flexibles qui est caractérisé par une dimension fractale de 2. La structure des agrégats SPI ne dépend pas du temps de chauffage ni de la température de chauffage pour $T > 60^\circ\text{C}$ (Chen et al 2016). La taille des agrégats formés dépend de la concentration en protéine

chauffées, du temps de chauffage et du pH du milieu. La masse molaire des agrégats augmente avec la concentration en protéine. Le mélange entre des agrégats fractals SPI et de WPI est possible mais aucune interaction entre ces deux types d'agrégats n'a été observée.

Nous avons montré que la microscopie confocal pouvait être utile pour mesurer le déplacement de traceurs fluorescents dans les suspensions denses des agrégats et les gels de WPI. Pour les agrégats fractals formés par chauffage des solutions natives de protéines globulaires à la concentration en protéine inférieure à C_g dans l'eau pure, une diffusion brownienne est observée. La diffusion des chaînes de dextran est plus rapide dans les suspensions de petits fractals que dans les suspensions de gros fractals. La diffusion des sondes dans les suspensions de microgels denses est beaucoup plus rapide que dans les suspensions d'agrégats fractals de même taille car des agrégats fractals sont moins denses et occupent plus d'espace à la même concentration en protéines. La dépendance avec la concentration du coefficient de diffusion des sondes est plus faible que celle de la viscosité des suspensions car les chaînes dextran sont flexibles et peuvent diffuser par reptation. La mobilité de chaînes polymères flexibles dans des suspensions denses d'agrégats fractals dépend donc à la fois de la taille et de la morphologie des agrégats de WPI.

Pour les gels de WPI formés en chauffant une solution native à $C > C_g$, certains traceurs sont piégés dans le gel. Le coefficient de diffusion des particules ne peut être déterminé que si la diffusion du traceur est Brownienne. Les rapports du D/D_0 des traceurs dans les gels homogènes diminuent fortement avec l'augmentation de la concentration en protéines. Cela montre qu'il y a une forte corrélation entre la concentration en protéine et la taille des pores du gel qui diminue avec l'augmentation de la concentration. Dans certains cas nous avons observé un piégeage partiel des chaînes de dextran parce que des chaînes du dextran sont polydisperses et une fraction de petites chaînes de dextran peut diffuser normalement tandis que les plus grandes chaînes sont piégées dans la matrice. Une plus grande fraction est piégée si les traceurs sont plus grands ou si la concentration en protéines est plus élevée.

Ce travail nous a permis d'étudier la structure d'agrégats de protéines de différentes tailles formés à pH neutre, ainsi que celle de microgels formés par ajout de sel. Nous avons mis au point un procédé de concentration par ultrafiltration permettant de conserver la stabilité des agrégats fractals et des microgels sur une large gamme de concentration.

Une des perspectives possibles de ce travail serait de poursuivre l'étude FRAP en considérant des traceurs qui seraient des agrégats fractals ou des microgels de WPI rendus nécessairement fluorescents. Cela nécessite de marquer les protéines natives ou les agrégats fractals avec du FITC de manière covalente sans modifier la structure de la protéine native ou la fonctionnalité des agrégats.

Annexe

Article 1: Structure and Flow of Dense Suspensions of Protein Fractal Aggregates in Comparison with Microgels.

Published in *Soft Matter*, 2016, 12, 2785-2793.

Walailuk Inthavong, Anna Kharlamova, Christophe Chassenieux, Taco Nicolai

LUNAM Université du Maine, IMMM UMR-CNRS 6283, Polymères, Colloïdes et Interfaces, 72085 Le Mans cedex 9, France

Abstract

Solutions of the globular whey protein β -lactoglobulin (β -lg) were heated at different protein concentrations leading to the formation of polydisperse fractal aggregates with different average sizes. The structure of the solutions was analyzed with light scattering as a function of the protein concentration. The osmotic compressibility and the dynamic correlation length decreased with increasing concentration and became independent of the aggregate size in dense suspensions. Results obtained for different aggregate sizes could be superimposed after normalizing the concentration with the overlap concentration. Dense suspensions of fractal protein aggregates are strongly interpenetrated and can be visualized as an ensemble of fractal 'blobs'. The viscosity of heated β -lg solutions increased extremely sharply above 80 g/L and diverged at 98 g/L, mainly due to the sharply increasing aggregate size. At fixed aggregate size, the viscosity increased initially exponentially with increasing concentration and then diverged. The increase was stronger when the aggregates were larger, but the dependence of the viscosity on the aggregate size was weaker than that of the osmotic compressibility and the dynamic correlation length. The concentration dependence of the viscosity of solutions of fractal β -lg aggregates is much stronger than that of homogeneous β -lg microgels. The behavior of fractal aggregates formed by whey protein isolate was similar.

Introduction

Globular proteins may be considered as dense nanoparticles that are stabilized in aqueous solutions by electrostatic repulsion. Heating aqueous protein solutions renders the rigid structure of the globular proteins mobile which may allow formation of bonds between the proteins and can cause irreversible aggregation. Aggregation leads to the formation of a percolating network above a critical gel concentration (C_g), but at lower concentrations stable suspensions of finite size aggregates are obtained¹⁻². The size of the aggregates increases with increasing protein concentration and diverges at C_g . The local structure of the aggregates and the value of C_g depend on the type of protein, the pH and the added salt. However, for a number of different globular proteins it has been shown that the large scale structure of the aggregates is self-similar³⁻⁹. Self-similar aggregates are characterized by their fractal dimension (d_f) which relates the molar mass (M) to the radius (R): $M \propto R^{d_f}$. The value of d_f was found to increase weakly from 1.7 when electrostatic interactions are strong to 2.0 when they are weak, but it does not depend on the type of protein.

Fractal protein aggregates have been studied extensively in dilute solutions, but as far as we are aware no systematic investigation has been done on the flow properties of dense suspensions of such aggregates. More in general, while dense suspensions of homogeneous spherical particles have been investigated in much detail¹⁰⁻¹³, dense suspensions of fractal aggregates have received relatively little attention¹⁴⁻¹⁷. An important difference between homogeneous particles and fractal aggregates is that the density of the former does not depend on their size, but for the latter it decreases with increasing size. Considering that the aggregates are spherical we may define their density as $\rho = 3M/(4\pi N_a R^3)$, with N_a Avogadro's number so that $\rho \propto R^{d_f-3}$. It has therefore been suggested that the viscosity of dense fractal aggregates can be understood in the same way as for homogeneous particles, by treating them as particles with a lower density. However, since fractal aggregates have an open structure, they are to a certain extent interpenetrable. This is especially important for fractal globular protein aggregates, which are very polydisperse, and are strongly interpenetrated in dense suspensions. In addition, it has been shown that fractal protein aggregates have some degree of flexibility¹⁸. Recently, it was demonstrated that interpenetration and flexibility of the fractal aggregates has important effects on the viscosity in dense suspensions¹⁹.

Here we present an investigation of the structure and the viscosity as a function of concentration for aqueous suspensions of fractal globular protein aggregates with different sizes. We will compare the viscosity of fractal aggregates with that of microgels formed by the same proteins²⁰, which enables a direct assessment of the effect of the structure of protein

particles. The globular protein used in this investigation was β -lactoglobulin (β -lg), which is the main component of whey. Stable suspensions of aggregates with different average sizes were formed by heating aqueous β -lg solutions at different protein concentrations at pH 7.0 until steady state was reached. It has already been reported elsewhere that at these conditions β -lg forms initially small curved strands with a hydrodynamic radius $R_h \approx 15$ nm. At higher protein concentrations these strands randomly associate into self similar aggregates with $d_f = 1.7$. In order to render our findings more relevant for applications we have compared the results obtained for aggregates formed by pure β -lg with those formed by a commercial whey protein isolate.

Materials and methods

Materials

The β -lactoglobulin (Biopure, lot JE 001-8-415) used in this study was purchased from Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, MN, USA) and consisted of approximately equal quantities of variants A and B. Whey protein isolate powder was purchased from Lactalis (Laval, France), which contained 95% protein on dry weight basis of which 70% β -lg and 20% α -lactalbumin. The molar masses of β -lactoglobulin and α -lactalbumin are 18 Kg/mol and 14 Kg/mol, respectively²¹. The powders were dissolved in Milli-Q water to which 200 ppm NaN_3 was added to prevent bacterial growth. The pH of the solution was adjusted to 7 by adding small amounts of NaOH 0.1 M. For light scattering; dilute solutions were filtered through 0.2 μm pore size Anatope filters. The protein concentration was determined by UV absorption at 278 nm using extinction coefficient $0.96 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and $1.05 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for β -lg and WPI, respectively. Protein solutions were concentrated by ultrafiltration utilizing the KrosFlo Research II/i/Tangential Flow Filtration (TFF) System (Spectrum Europa B.V.)

Light scattering

Light scattering measurements were done using an ALV-5000 multibit, multitaup, full digital correlator in combination with a laser emitting vertically polarized light at $\lambda = 632$ nm (ALV-Langen). The temperature was controlled by a thermo-stat bath to within ± 0.1 °C. The relative excess scattering intensity (I_r) was determined as the total intensity minus the solvent

scattering divided by the scattering of toluene at 20°C. I_r is related to the osmotic compressibility $((d\pi/dC)^{-1})$ and the z-average structure factor $(S(q))$ ²²⁻²³:

$$I_r = K.C.RT.(d\pi/dC)^{-1}S(q) \quad 1$$

with R the gas constant and T the absolute temperature and q the scattering wave vector.

$$K = \frac{4\pi^2 n^2}{\lambda^4 N_a} \cdot \left(\frac{dn}{dC}\right)^2 \cdot \left(\frac{n_s}{n}\right)^2 \cdot \frac{1}{R_s} \quad 2$$

where (dn/dC) is the refractive index increment, and R_s is the Rayleigh ratio of toluene. $(n_s/n)^2$ corrects for the difference in scattering volume of the solution with refractive index n and toluene with refractive index n_s . $S(q)$ describes the dependence of I_r on the scattering wave vector: $q=(4\pi n/\lambda).\sin(\theta/2)$, with θ the angle of observation. We used $dn/dC= 0.189 \text{ cm}^3/\text{g}$ and $R_s= 1.35 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$. In dilute solutions and in the limit of $q \rightarrow 0$, I_r/KC is equal to the weight average molar mass (M_w). At finite concentrations we measure an apparent molar mass (M_a) that is proportional to the osmotic compressibility: $M_a=RT/(d\pi/dC)$. The initial concentration dependence of M_a can be expressed in terms of a virial expansion:

$$M_a=M_w/(1+2A_2M_wC+\dots) \quad 3$$

The initial q-dependence of the structure factor $C \rightarrow 0$ can be used to obtain the z-average radius of gyration (R_g):

$$S(q)=(1+q^2.R_g^2/3)^{-1} \quad 4$$

At higher concentrations, when interactions cannot be neglected, the initial q-dependence of structure factor can be expressed in terms of the static correlation length (ξ_s):

$$S(q)=(1+q^2.\xi_s^2)^{-1} \quad 5$$

The normalized intensity autocorrelation ($g_2(t)$) that is measured with dynamic light scattering (DLS) is related to the normalized electric field correlation function, $g_1(t)$: $g_2(t) = 1 + g_1(t)^2$ ²⁴. $g_1(t)$ was analyzed in terms of a distribution of relaxation times using the REPES routine²⁵:

$$g_1(t) = \int A(\log \tau) \exp(-t/\tau) d\log \tau \quad 5$$

In all cases monomodal distributions were observed and the correlograms could be well described using the following analytical expression for $A(\log \tau)$:

$$A(\log \tau) = k\tau^p \exp\left[-\left(\tau / \tau^*\right)^s\right] \quad 6$$

In binary solutions the relaxation of the intensity fluctuations is caused by cooperative diffusion of the solute and cooperative diffusion coefficient can be calculated from the average relaxation rate: $D_c = (q^2 \cdot \tau)^{-1}$. The dynamic correlation length (ξ_d) can be calculated from D_c at $q \rightarrow 0$:

$$D_c = \frac{kT}{6\pi\eta\xi_d} \quad 7$$

with η the viscosity, k Boltzman's constant, and T the absolute temperature. When interactions can be neglected, i.e. at low concentrations, ξ_d is equal to the z-average hydrodynamic radius. We note that the z-average values of R_h and R_g determined by light scattering give strong weight to the larger particles in the distribution and even more so for R_g than for R_h .

Rheology

The viscosity was measured as a function of the shear rate using a rheometer (AR1000, TA Instruments) with a cone and plate or a couette geometry. After loading the samples were pre-sheared at 100 s^{-1} during 1 min. The viscosity was determined during subsequent shear ramps with increasing and decreasing shear rates. The results obtained with

increase and decreasing shear rates were found to be the same. Measurements done using the cone and plate geometry showed an upturn at low shear rates, which was due to the formation of a weak elastic surface layer of proteins. In ref. ²⁶ it was shown that this effect can be much reduced by using a couette geometry. Therefore for one series of samples we have used both geometries and found that indeed the artificial increase was no longer observed. Nevertheless, the same results can be obtained by both geometries after superposition of the data at different concentrations, see Supplementary Information. As a much larger quantity of solution is needed for the couette geometry, we have used for the other series of measurements the cone and plate geometry.

Results

Characterization of the aggregates.

Fractal aggregates of β -lg and WPI with different sizes were prepared by heating at 80°C aqueous solutions with different protein concentrations at pH 7.0 until steady state was reached. At steady state all proteins are denatured and for $C > 40\text{g/L}$ more than 90% of the proteins form aggregates¹⁸. The remaining proteins are present in the form of monomers, dimers and trimers. As was mentioned in the Introduction, detailed investigations of the fractal structure of aggregates formed by heating β -lg or WPI in aqueous solution have already been reported elsewhere^{3-4, 18}. Characterization of the aggregates used for the present investigation by light scattering showed that their structure was same as that reported in the literature.

The weight average molar mass (M_w) of the aggregates was determined using light scattering as described in the Material and Methods section. The dependence of M_w on the concentration at which the aggregates were formed is shown in figure 1a. At low concentrations relatively monodisperse strands were formed, but for $C > 40\text{g/L}$, random aggregation of these strands led to an increase of M_w with increasing concentration. The molar mass diverged at a critical gel concentration $C_g = 98\text{g/L}$. The z-average radius of gyration (R_g) and the z-average hydrodynamic radius (R_h) increased with increasing M_w following a power law, which is expected for fractal aggregates, see figure 1b. The dependence of both R_h and R_g on M_w is compatible with $d_f = 1.7$, but R_h is systematically smaller than R_g by a factor of about 0.7, in agreement with findings reported earlier¹⁸. The

principal reason for this difference is the polydispersity of the aggregates, R_g is derived from the z-average of R_g^2 and R_h from the z-average of R_h^{-1} . Therefore R_g is more sensitive to larger aggregates.

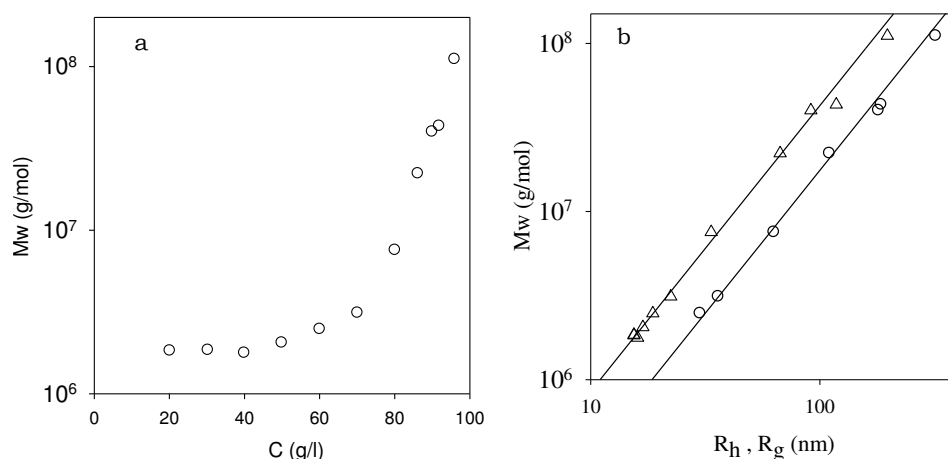


Fig. 1a Molar mass of β -lg aggregates formed in heated aqueous solutions as a function of the protein concentration.

Fig. 1b Dependence of the molar mass of β -lg aggregates on the radius of gyration (circles) or the hydrodynamic radius (triangles).

Structure of the aggregate solutions

The structure of solutions containing aggregates with different sizes was studied with light scattering over a range of concentrations. Fig. 2 shows I_r/KC for large aggregates that were formed by heating at $C=96$ g/L and that were subsequently progressively diluted. At high protein concentrations the structure factor was independent of q in the range covered by light scattering, implying that the correlation length of the concentrated solutions was less than 15nm. It was shown elsewhere²⁷ using small angle X-ray scattering experiments that the structure factor of concentrated aggregate solutions shows a peak implying a certain degree of order in the distribution of the proteins. The osmotic compressibility and the correlation length of the concentration fluctuations increased with decreasing concentration causing an increase of I_r/KC and a stronger q -dependence.

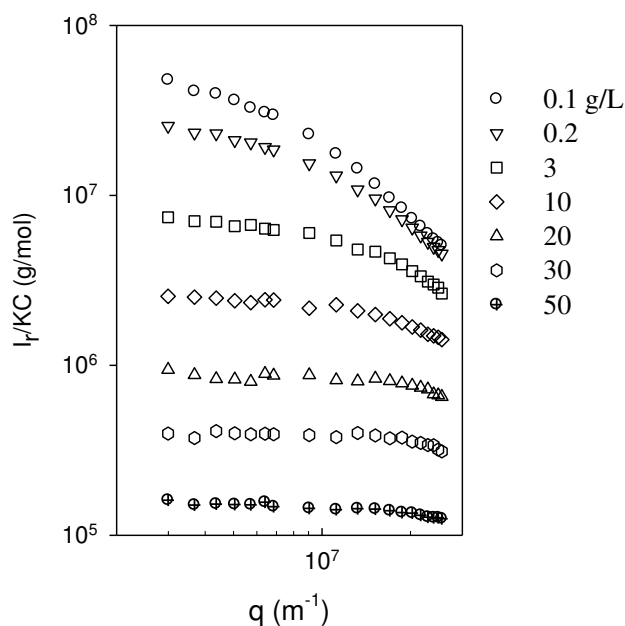


Fig. 2 Dependence of I_r/KC on q for aggregates formed by heating at $C=96$ g/L and subsequently diluted to different concentrations as indicated in the figure.

Fig. 3a shows the concentration dependence of the apparent molar mass ($M_a = I_r/KC_{(q \rightarrow 0)}$) for protein aggregates with different sizes obtained by heating at different concentrations. As was mentioned above, M_a is proportional to the osmotic compressibility and is equal to M_w if interactions are negligible, i.e. at low concentrations. In all cases the osmotic compressibility decreased with increasing concentration, due to electrostatic and excluded volume interactions between the aggregates and at the highest concentrations M_a became independent of the aggregate size. The latter implies that in dense suspensions the aggregates are strongly interpenetrated and that the osmotic compressibility is determined by interaction between the elementary units of the aggregates.

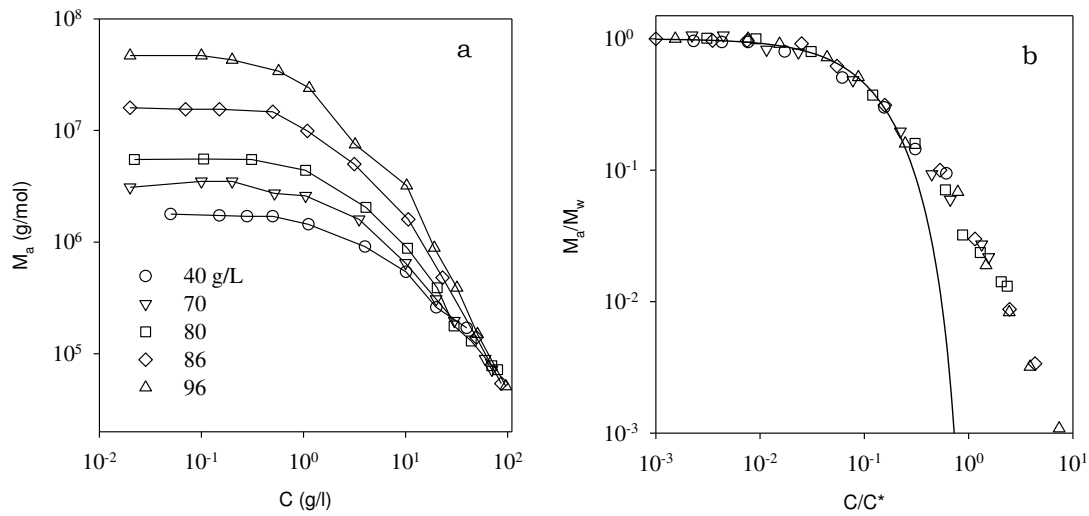


Fig.3a Concentration dependence of M_a for aggregates formed by heating at different protein concentrations indicated in the figure. The same data are plotted in fig. 3b after normalizing M_a with M_w and C with C^* . The solid line in fig. 3b represents eq.8.

For non-interacting hard spheres, M_a/M_w can be well described by the following equation²⁸:

$$\frac{M_a}{M_w} = \frac{(1-\phi)^4}{1+4\phi+4\phi^2-4\phi^3+\phi^4} \quad 8$$

where ϕ is the volume fraction of the particles. For solutions of polydisperse soft particles such as the protein aggregates, the initial concentration dependence of M_a/M_w can still be described by eq.8 if for ϕ we use an effective volume fraction: $\phi_e=C/C^*$, where C^* is the concentration at which the effective volume fraction of the particles is unity and is related to the second virial coefficient: $C^*=A_2/(4M_w)$. When expressed in units of volume the second virial coefficient is 4 times the effective volume of the particles. Fig. 3b shows that eq.8 describes the results in this representation up to $C/C^* \approx 0.2$. At higher protein concentrations, M_a decreased less steeply than for equivalent hard spheres, because the aggregates are polydisperse and can interpenetrate. As expected, the values of C^* decreased with increasing aggregate size, see fig. 4.

For spherical particles C^* can also be calculated from their molar mass and their radius:

$$C^* = 3M_w / (4\pi R^3 N_a) \quad 9$$

For monodisperse non-interacting hard spheres the two methods give the same value, but for polydisperse or interacting particles they will be different. For the polydisperse protein aggregates studied here, the values calculated using eq. 9 are smaller if one uses R_g for the radius than if one uses R_h , see fig. 4. The values of C^* obtained from the comparison of the concentration dependence of M_a with eq. 8 were intermediate between those calculated using eq. 9 with $R=R_h$ or $R=R_g$. However, the molar mass dependence was weaker, which is a consequence of the increasing polydispersity with increasing M_w .

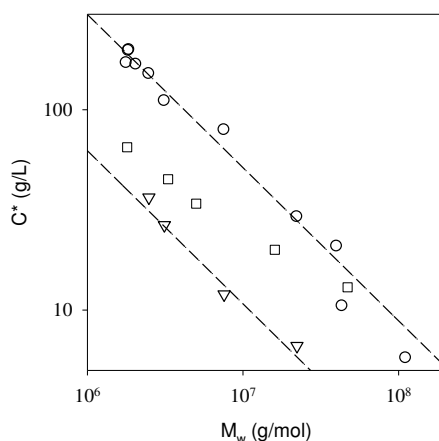


Fig. 4. Dependence of C^* on the molar mass for fractal β -Ig aggregates. The data obtained from fits of the initial concentration dependence of M_a to eq. 8 are indicated by squares, whereas the circles and the triangles indicate the values calculated using eq. 9 with R_h and R_g , respectively. The dashed lines indicate the power law dependence corresponding to the one shown in fig. 1b.

As can be seen in fig.2, interpenetration of the aggregates caused a decrease of the correlation length with increasing concentration. At higher concentrations, the static correlation length became too small to determine with light scattering, but the dynamic correlation length (ξ_d) obtained from dynamic light scattering could be determined over the whole concentration range. As was discussed in ref. ¹⁸, in dilute solutions the q -dependence of

the diffusion coefficient increases with increasing aggregate size, showing that the fractal aggregates are semi-flexible. With increasing concentration the q -dependence the q -dependence decreases as the correlation length of the concentration fluctuations decreases. ξ_d obtained from the cooperative diffusion coefficient extrapolated to zero- q decreased with increasing concentration down to values approaching the radius of monomeric β -lg that is about 2nm. Fig. 5 shows that ξ_d has the same power law dependence on M_a as R_h on M_w independent of the aggregate size. The structure of the interpenetrated aggregate solution can thus be visualized as an ensemble of fractal ‘blobs’ with radius ξ_d and molar mass M_a , independent of the aggregate size. The peak in the structure factor at larger q -values that was found with SAXS²⁷ implies that the ‘blobs’ are regularly distributed in salt free solutions.

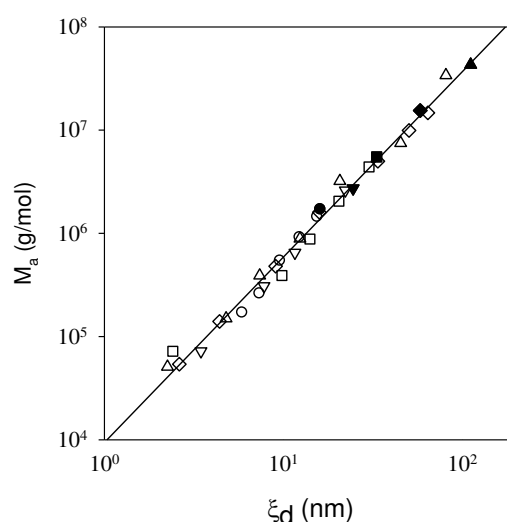


Fig. 5 Dependence of the apparent molar mass on the dynamic correlation length for solutions of aggregates with different sizes measured at different protein concentrations. The filled symbols represent values at infinite dilutions where $M_a=M_w$ and $\xi_d=R_h$. The solid line has slope 1.7. The symbols are as in fig.3a.

Viscosity

Solutions of β -lg at different concentrations were loaded on the rheometer after heating and the viscosity (η) was determined as a function of the shear rate ($\dot{\gamma}$). For the more viscous solutions we observed shear thinning at larger shear rates, see fig.6a. We also observed an increase of the viscosity with decreasing shear rate at low shear rates. However, as was mentioned in the materials and methods section, this increase is an artifact caused by

the formation of a layer of proteins at the interface. If we ignore the artificial increase at low shear rates, the results obtained at different concentrations can be superimposed by horizontal and vertical shift factors, see fig. 6b. This allowed us to obtain the limiting low shear viscosity (η_0) at all concentrations.

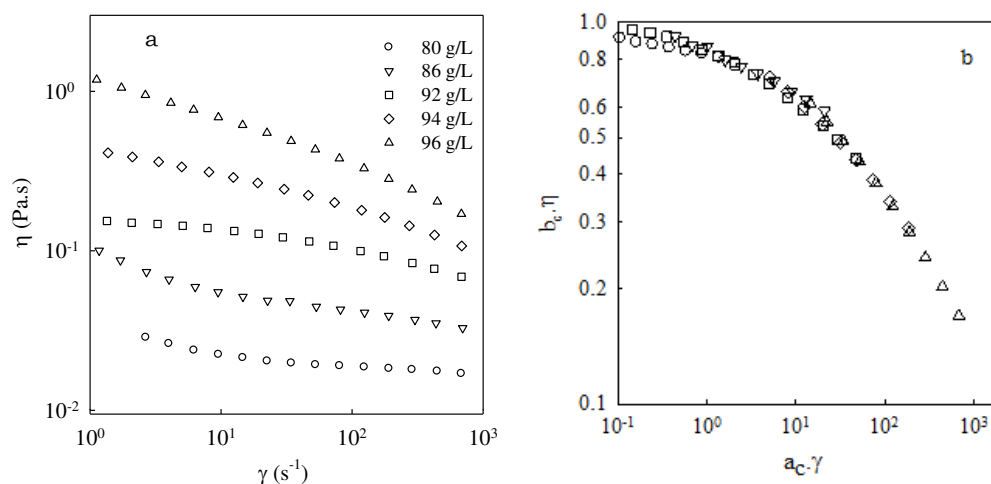


Fig. 6a Shear rate dependence of the viscosity of heated β -Ig solutions at different concentrations. Fig. 6b shows a master curve of the same data obtained by horizontal and vertical shifts with respect to the data at C=96 g/L. The artificial upturns at low shear rates were removed from the master curve.

η_0 increased very sharply with increasing protein concentration for $C > 70$ g/L and diverged at the gel concentration, see fig. 7a. The sharp increase of η_0 was caused by a combination of increasing protein concentration and increasing aggregate size. In order to distinguish these two effects, we measured the shear rate dependent viscosity as a function of the protein concentration keeping the aggregate size fixed. To this end, a solution of aggregates formed at C=96 g/L with $R_g=320$ nm was progressively diluted. Master curves could be obtained by superposition of the results obtained at different dilutions, see supplementary results. The concentration dependence of η_0 for the aggregates with fixed size formed at C=96 g/L and subsequently diluted is compared in fig. 7a with that of aggregates with different sizes formed at different concentrations. Even though the concentration dependence of η_0 for solutions with the same large aggregates was steep, it was much more progressive than that of aggregates formed at different concentrations. This clearly demonstrates that the effect of increasing the aggregate size is more important than the effect

of increasing the protein concentration. Similar results were obtained with a commercial WPI sample, see fig. 7b, which is not surprising, because WPI forms similar fractal aggregates in heated aqueous solutions⁴. The WPI solutions gelled at a slightly lower protein concentration (95g/L) and therefore the steep increase of the viscosity occurred at slightly lower concentrations. In the following we focus on the results obtained with pure β -lg.

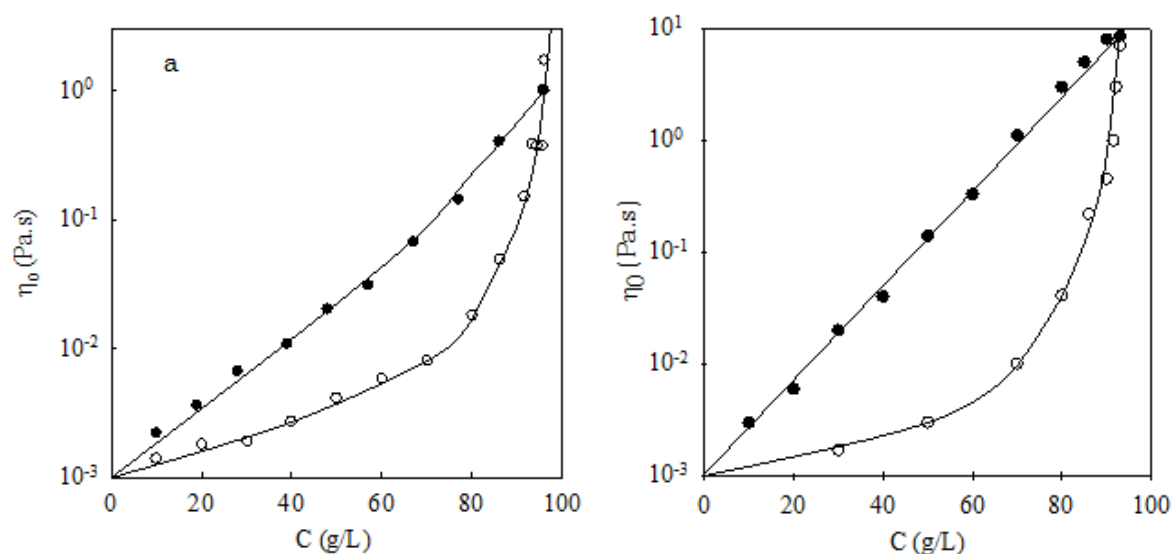


Fig.7a Zero shear rate of the viscosity for β -lg solutions that were heated at different concentrations (open symbols) or that were heated at $C=96$ g/L and subsequently diluted (closed symbols). Fig. 7b shows the results obtained for WPI heated at different concentrations (open symbols) or that were heated at $C=93$ g/L and subsequently diluted (closed symbols).

In order to investigate the effect of the average aggregate size on the concentration dependence of η_0 , solutions with different β -lg concentrations were heated. The viscosity of each system was subsequently measured as a function of the protein concentration by dilution. The smaller aggregates obtained by heating at $C=40$ g/L and $C=70$ g/L were first concentrated by ultrafiltration. Fig. 8a shows that in each case η_0 increased exponentially up to approximately 0.03 Pa.s: $\eta_0 = \eta_s \exp(C/C_c)$, with η_s the solvent viscosity. The exponential increase obtained for the different aggregates superimposed when η_0 was plotted as a function

of C/C_c , see fig. 8b. C_c decreased weakly with increasing aggregate size from $C_c=35$ g/L for $M_w=1.5 \times 10^6$ g/mol to $C_c=16.5$ g/L for $M_w=1.1 \times 10^8$ g/mol, see inset of fig. 8b.

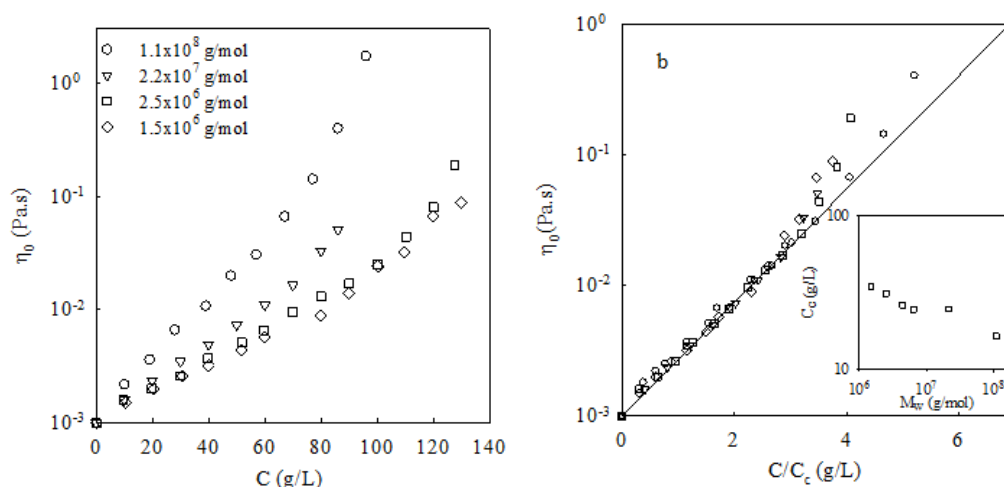


Fig. 8a Concentration dependence of η_0 for solutions of β -lg aggregates with different molar masses indicated in the figure.

Fig. 8b Master curve of the results shown in fig. 8a obtained by dividing C with C_c . The solid line represents $\eta_0 = \eta_s \exp(C/C_c)$. The dependence of C_c on M_w is shown in the inset, which also includes results obtained for 2 other aggregate sizes for which the concentration dependence was not shown for clarity.

At higher protein concentrations, η_0 increased more steeply until it diverged and a gel was formed. We also observed that at these higher concentrations the viscosity increased slowly with time and in some cases weak gels were formed with time. It appears that bonds formed slowly between aggregates in these dense protein aggregate suspensions causing a rise in the viscosity or gelation. This phenomenon of so-called cold gelation is well known to occur when electrostatic repulsion is reduced by adding salt or reducing the pH¹. The rate of gelation increased with increasing aggregate concentration, but for all systems studied here the effects on the viscosity was negligible during the first two days. Notice, however, that the scattering intensity and ξ_d were stable even if gels were formed, implying that formation of the bonds occurred without a significant change in the structure of the solutions.

We have compared the behavior of large fractal aggregates with that of homogeneous microgels. As was discussed in ref.²⁹, microgels can be formed by heating β -lg solutions in the presence of a small amount of CaCl_2 . For the present investigation the microgels were formed by heating a β -lg solution at $C=40$ g/L in the presence of 4.5mM CaCl_2 . With light

scattering techniques the following characteristics were obtained: $M_w=1.1 \times 10^9$ g/mol, $R_h=160$ nm, $R_g=200$ nm. The structure of concentrated microgel suspensions could not be studied using light scattering, because they were highly turbid. In fig.9 the concentration dependence of η_0 of microgels is compared to that of the fractal aggregates. The viscosity of the fractal aggregate solutions increased more steeply with increasing protein concentration than for the microgel solutions, which was expected because the density of the latter is higher.

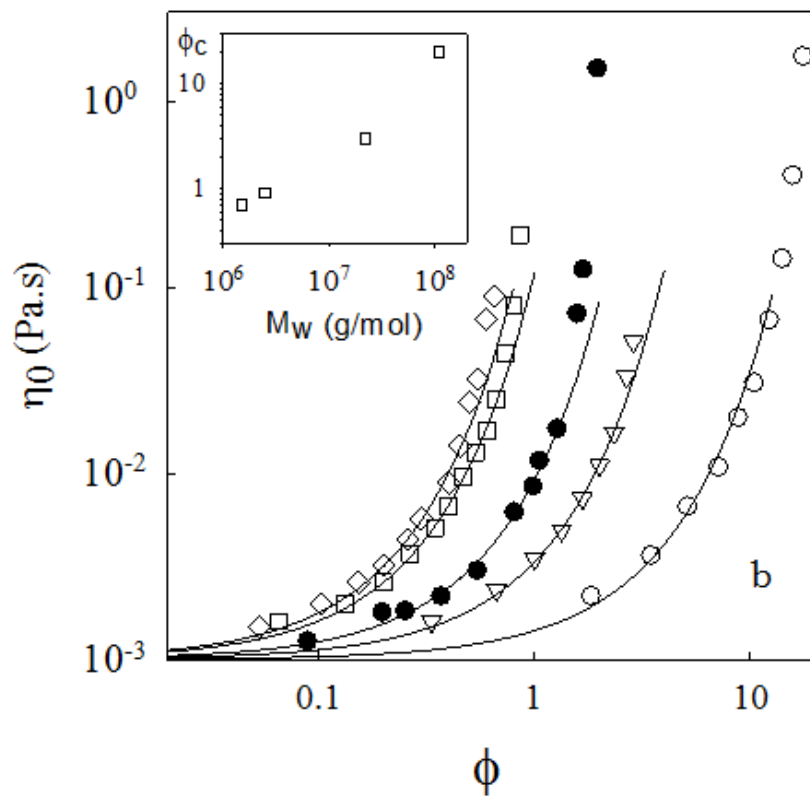
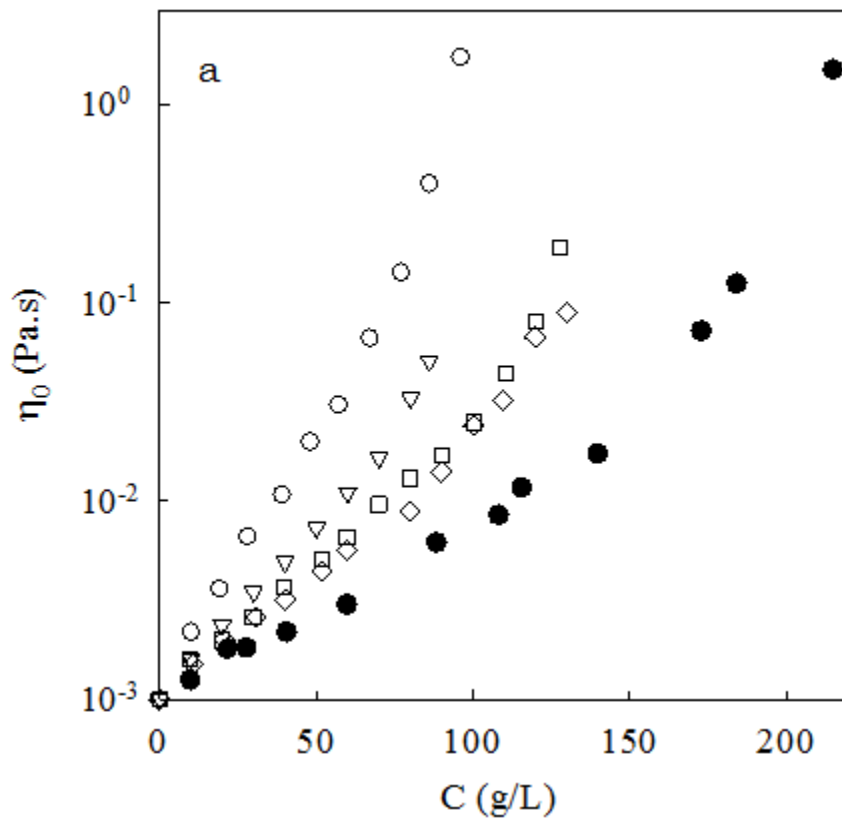


Fig. 9 Dependence of the zero shear viscosity on the concentration (a) or the volume fraction (b) of solutions of fractal aggregates (open symbols) and microgels (filled symbols). Note that in fig. 9b the horizontal axis is logarithmic. The solid lines in fig. 9b represent exponential increases of η_0 with φ . Different open symbols represent different molar masses as indicated in fig 8. The inset of fig. 9b shows the molar mass dependence of φ_c .

Alternatively, we may compare the viscosity as a function of the effective volume fraction calculated as $\varphi_e = C/C^*$. In fig. 9b, η_0 is plotted as a function of φ_e with C^* calculated using in eq. 9 the hydrodynamic radius. The values of C^* calculated in this way are shown in fig. 4 for the fractal aggregates and for the microgels $C^* = 110$ g/L. In this representation, the viscosity of the microgel suspensions increased more steeply than for fractal aggregates with $M_w = 1.1 \times 10^8$ g/mol and $M_w = 2.2 \times 10^7$ g/mol, but less steeply than for the smaller aggregates. η_0 diverged at $\varphi_c \approx 2$ for the microgels and $\varphi_c \approx 20, 3, 0.9$ and 0.7 for the fractal aggregates with $M_w = 1.1 \times 10^8, 2.2 \times 10^7, 2.5 \times 10^6$, and 1.5×10^6 g/mol, respectively, see inset of fig. 9b. Except for the smallest aggregates, φ_c is larger than that of monodisperse hard spheres for which the viscosity diverges close to random close packing ($\varphi_c = 0.63$).

In part this can be explained by the polydispersity of the aggregates, which is large because they were formed by a random reaction limited aggregation process³. As was mentioned above, the values of R_g and R_h obtained from light scattering are strongly weighted by the largest aggregates so that the calculated value of C^* is too small and therefore φ_e is too large. The overestimation of φ_e would have been even worse if R_g or A_2 had been used to calculate C^* . The polydispersity of the fractal aggregates increases with increasing average size, which means that φ_e is increasingly overestimated. In fact, as was mentioned in the introduction, the smallest aggregates are not fractal, but relatively monodisperse curved strands and are the building blocks of the larger fractal aggregates. The microgels are much less polydisperse than the larger fractal aggregates so that the overestimation φ_e is less important.

A second reason for the large values of φ_e is that the protein particles are soft so that they can be compressed to some extent. Much more importantly, polydisperse fractal aggregates interpenetrate in dense suspensions and the smaller aggregates are embedded within the larger ones. This effect is more important for larger fractal aggregates. As a consequence, the increase of the viscosity at a given concentration by using fractal aggregates

instead of microgels or by using larger instead of smaller fractal aggregates is much less important than might have been anticipated from the difference in C^* calculated from M_w and R_h or R_g .

Discussion

We have compared the behavior of dense suspensions of two types of protein aggregates. In pure water relatively monodisperse protein strands were formed for $C < 50 \text{ g/L}$, which were the elementary units of the larger fractal aggregates formed at higher concentrations. Aggregation of the strands was reaction controlled and led to increasing polydispersity with increasing aggregate size. Solutions of the fractal aggregates were transparent, because smaller aggregates were embedded in the larger aggregates in a hierarchical manner. In addition, electrostatic repulsion between the proteins induced a weak local order. Interpenetration of the fractal aggregates explains why the structure of dense suspensions was independent of the aggregate size. The osmotic compressibility and the correlation length of dense suspensions were determined by the interactions between the elementary units of the fractal aggregates, i.e. small protein strands.

Spherical microgels of globular proteins were formed by addition of a small amount of CaCl_2 before heating. They probably consist of densely cross-linked network of small strands^{20, 30}. The molar mass of microgels is much larger than that of fractal aggregates of the same size and therefore they scatter much more light. In addition, they are much less polydisperse and smaller microgels cannot penetrate larger ones. As a consequence, microgel suspensions were turbid at higher concentrations and the structure of dense suspensions could not be evaluated wby light scattering techniques.

The viscosity of colloidal particles as a function of their concentration has been extensively studied in the past and the effects of their architecture and the interaction between the particles have been reviewed^{10-13, 31}. The viscosity diverges at a critical volume fraction and the dependence on ϕ has often been described by the Krieger-Dougherty equation³² or the Quemada model³³: $\eta_0 = \eta_s (1 - \phi/\phi_c)^{-2}$. For monodisperse hard spheres ϕ_c is the concentration of close-packing, but in order to account for the effects of polydispersity, interaction or softness of the colloids ϕ_c has often been considered as an adjustable parameter. The same equation has been used to describe the concentration dependence for rigid clusters

of randomly aggregated colloids¹⁴⁻¹⁷. The critical volume fraction of the colloids was found to decrease with increasing size of the fractal aggregates, because the density of the fractal aggregates decreased.

Here we find that the concentration dependence of the viscosity of the protein aggregates is much better described by an exponential increase except close to ϕ_c . An exponential increase of the viscosity was also reported for dendrimers³⁴, polymeric micelles³⁵ and randomly aggregated star polymers¹⁹. The latter study is particularly relevant here, because it is the only investigation of the viscosity of interpenetrated randomly aggregated particles with flexible bonds. Similarly to the fractal protein aggregates, the osmotic compressibility of crosslinked star polymers could be described by eq.8 up to $\phi \approx 0.4$ and decreased more slowly at higher concentrations. Also for this system, the osmotic compressibility at high concentrations was found to be independent of the size of the aggregates and was determined by the interaction between the elementary units of the aggregates, i.e. the star polymers. The behavior of flexible fractal aggregates is very different from that of the rigid clusters, mainly because they can interpenetrate, but also because they are soft. This means that the viscosity of such systems cannot be interpreted in terms of the cumulated volume fraction of the aggregates.

If size of the aggregates is increased at a fixed concentration, the effect on the viscosity will be different for fractal aggregates and microgels. For fractal aggregates the viscosity will increase with increasing aggregate size, because the density of the aggregates decreases. However, if larger microgels are formed at a fixed concentration the viscosity remains the same, assuming that the polydispersity and softness of the microgels does not depend on their size, because the volume fraction remains the same. If the size of the aggregates increases with increasing concentration as was the case for the fractal aggregates formed at different concentrations, the viscosity increases very steeply due to the combined effects of increasing size and increasing concentration. Comparison of the two situations for globular protein aggregates showed that former effect was most important.

Conclusion

Fractal aggregates are formed by heating globular proteins in aqueous solutions at pH 7. The average aggregate size increases if the concentration at which the proteins are heated

is increased and diverges at the critical gel concentration. For a given aggregate size the viscosity increases exponentially with the protein concentration. The increase is steeper if the aggregates are larger, because the density of the aggregates decreases with increasing size. However, the effect of the aggregate size is smaller than expected from the decrease of the density, because the aggregates are very polydisperse and smaller aggregates are embedded within the larger ones. The viscosity of protein solutions after heating at different concentrations rises very sharply over a small concentration range close to the critical gel concentration, because the average size of the aggregates rises sharply. The osmotic compressibility and the correlation length of the concentration fluctuations decrease with increasing concentration and are independent of the aggregate size at high concentrations, where they are determined by the interaction between the elementary units of the aggregates. The behaviour of aggregates formed by WPI is close to that for β -Ig aggregates.

The behavior of microgels formed by heating globular proteins in the presence of a small amount of CaCl_2 is different from that of fractal aggregates, because they are denser and cannot interpenetrate. Therefore the increase of the viscosity of microgel solutions with increasing protein concentration is weaker and does not depend on the size of the microgels.

References

1. T. Nicolai, M. Britten and C. Schmitt, *Food Hydrocolloids*, 2011, **25**, 1945-1962.
2. R. Mezzenga and P. Fischer, *Reports on Progress in Physics*, 2013, **76**, 046601.
3. J. C. Gimel, D. Durand and T. Nicolai, *Macromolecules*, 1994, **27**, 583-589.
4. N. Mahmoudi, S. Mehalebi, T. Nicolai, D. Durand and A. Riaublanc, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 3104-3111.
5. T. Hagiwara, H. Kumagai and K. Nakamura, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1996, **60**, 1757-1763.
6. N. Micali, V. Villari, M. A. Castriciano, A. Romeo and L. Monsù Scolaro, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**, 8289-8295.
7. R. Vreeker, L. Hoekstra, D. Den Boer and W. Agterof, *Food Hydrocolloids*, 1992, **6**, 423-435.
8. M. Weijers, R. W. Visschers and T. Nicolai, *Macromolecules*, 2002, **35**, 4753-4762.
9. L. Donato, C. Garnier, J. L. Doublier and T. Nicolai, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 2157-2163.
10. D. B. Genovese, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2012, **171-172**, 1-16.
11. D. Quemada and C. Berli, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2002, **98**, 51-85.
12. F. Sciortino and P. Tartaglia, *Advances in Physics*, 2005, **54**, 471-524.
13. D. Vlassopoulos and M. Cloitre, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2014, **19**, 561-574.

14. T. Aubry, B. Largenton and M. Moan, *Journal of colloid and interface science*, 1998, **202**, 551-553.
15. I. R. Collins, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, **178**, 361-363.
16. C. Tsenoglou, *J. Rheol.*, 1990, **34**, 15-24.
17. N. Kovalchuk, I. Kuchin, V. Starov and N. Urieu, *Colloid Journal*, 2010, **72**, 379-388.
18. K. Baussay, C. Le Bon, T. Nicolai, D. Durand and J. Busnel, *International Journal of biological Macromolecules*, 2004, **34**, 21-28.
19. R.-P. Nzé, T. Nicolai, C. Chassenieux, E. Nicol, S. Boye and A. Lederer, *Macromolecules*, 2015.
20. T. Nicolai, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015.
21. M. Boland, H. Singh and A. Thompson, *Milk proteins: from expression to food*, Academic Press, 2014.
22. W. Brown, *Light Scattering. Principles and Developments*, Clarendon Press, Oxford, 1996.
23. J. S. Higgins and K. C. Benoit, *Polymer and Neutron Scattering*, Clarendon Press, Oxford, 1994.
24. B. Berne and R. Pecora, *Dynamic light scattering With Applications to Chemistry, Biology, and physics*, Dover Publications, New York, 2000.
25. W. Brown, *Dynamic Light Scattering: The method and some applications*, Clarendon Press Oxford, 1993.
26. V. Sharma, A. Jaishankar, Y.-C. Wang and G. H. McKinley, *Soft Matter*, 2011, **7**, 5150-5160.
27. M. Pouzot, T. Nicolai, R. W. Visschers and M. Weijers, *Food Hydrocolloids*, 2005, **19**, 231-238.
28. N. F. Carnahan and K. E. Starling, *Journal of Chemical Physics*, 1969, **51**, 635-636.
29. T. Phan-Xuan, D. Durand, T. Nicolai, L. Donato, C. Schmitt and L. Bovetto, *Food Hydrocolloids*, 2014, **34**, 227-235.
30. C. Schmitt, C. Moitzi, C. Bovay, M. Rouvet, L. Bovetto, L. Donato, M. E. Leser, P. Schurtenberger and A. Stradner, *Soft Matter*, 2010, **6**, 4876-4876.
31. D. Vlassopoulos and G. Fytas, in *High Solid Dispersions*, Springer Berlin Heidelberg, 2010, vol. 236, pp. 1-54.
32. I. M. Krieger, *Adv. Coll. Int. Sci.*, 1972, **3**, 111-136.
33. D. Quemada, *Rheologica Acta*, 1977, **16**, 82-94.
34. I. B. Rietveld and D. Bedeaux, *Journal of colloid and interface science*, 2001, **235**, 89-92.
35. N. Merlet-Lacroix, E. Di Cola and M. Cloitre, *Soft Matter*, 2010, **6**, 984-993.

Article 2: The Effect of Aggregation into Fractals or Microgels on the Charge Density and the Isoionic Point of Globular Proteins.

Published in Food Hydrocolloids, 2016, 470-475.

Anna Kharlamova, Walailuk Inthavong, Taco Nicolai, Christophe Chassenieux
*LUNAM Université du Maine, IMMM UMR-CNRS 6283, Polymères, Colloïdes et Interfaces,
72085 Le Mans cedex 9, France*

Abstract

Potentiometric titration curves were obtained for aqueous solutions of native whey protein isolate (WPI) and β -lactoglobulin (β -lg) at different NaCl concentrations. The curves crossed at approximately the same pH, which is considered to be the isoionic point (IIP). Titration with NaCl confirmed that the pH was independent of the salt concentration up to 0.1M at the IIP, which was 4.9 for WPI and 5.0 for β -lg. Fractal aggregates and microgels of different sizes were formed by heating protein solutions at different pH and different concentrations. The titration curves of the aggregates depended on the type of aggregates, but not on their size. The IIP increased by at most 0.2 pH units after aggregation. For a given pH larger than IIP, the charge density of the proteins (α) was reduced after denaturation and aggregation. The reduction was stronger for microgels than for fractal aggregates. Addition of NaCl or increasing the protein concentration mitigated the effect. Comparison between WPI and β -lg showed that the pH dependence of α was almost the same for pH>5.0 both for native and aggregates proteins.

Introduction

Globular proteins have a dense well-defined structure in aqueous solutions. The net charge of proteins (α) is negative at high pH and positive at low pH, but over a wide pH range they contain both negatively and positively charged amino acids. The pH where $\alpha=0$ in the absence of adsorbed ions is called the isoionic point (IIP) and depends on the type of protein (Bryan, 1978; Cannan, 1942; Longsworth and Jacobsen, 1949; Salis et al., 2011) . When globular proteins are heated their relatively rigid structure becomes more mobile, which

allows the formation of bonds with other proteins causing aggregation (Amin, Barnett, Pathak, Roberts and Sarangapani, 2014; Mezzenga and Fischer, 2013) . It was found that the morphology of the aggregates depends on the pH (Krebs, Devlin and Donald, 2007; Langton and Hermansson, 1992; Nicolai and Durand, 2013) . When the net charge of the proteins is high, relatively thin strands are formed, but when the pH is close to the IIP, spherical microgels are formed. At higher protein concentrations, the strands or the microgels will randomly crosslink into self-similar clusters that increase in size when the protein concentration is increased until at a critical concentration a system spanning network is formed (Clark, Kavanagh and Ross-Murphy, 2001; van der Linden and Foegeding, 2009) .

Experimentally, the effect of α on the aggregation process is studied by varying the pH. However, it is long since known that the charge density of proteins at a given pH depends on the ionic strength, the type of ions, and the protein concentration (Bryan, 1978; Cannan, 1942; Cannan, Kibrick and Palmer, 1941; Longsworth et al., 1949; Nozaki, Bunville and Tanford, 1959; Sørensen, Linderstrøm-Lang and Lund, 1927; Tanford and Wagner, 1954) . Therefore, when aggregation is compared at different concentrations or ionic strengths at a fixed pH value, α is not kept constant and, consequently, observed effects of the protein or salt concentration on aggregation for a given pH can be caused in part by a change of the charge density. In order to relate the aggregation process of proteins to their net charge density it is important to know how α relates to the pH at the conditions at which the aggregation occurred. In addition, aggregation of proteins may affect their buffer capacity and therefore the relationship between the pH and α . As far as we are aware, no systematic investigation of the effect of heat-induced aggregation on the relationship between the pH and the net charge density of globular proteins has been reported in the literature.

The effect of the pH and the ionic strength on heat-induced aggregation of globular proteins has probably been most intensively investigated for β -lactoglobulin (β -lg) and whey protein isolate (WPI) (Guyomarc'h et al., 2014; Kontopidis, Holt and Sawyer, 2004; Nicolai, Britten and Schmitt, 2011) . The latter contains mainly β -lg, but also α -lactalbumin (α -lac) and of other types of proteins (De Wit, 1998) . Here we present a systematic investigation of the relationship between the pH and the charge density of native and aggregated β -lg and WPI as a function of the NaCl and the protein concentration using potentiometric titration. We will discuss the effect of the pH on aggregation of whey proteins reported in the literature in the light of the results that were obtained in the present study.

Materials and methods

The β -lg (Biopure, lot JE 001-8-415) used in this study was purchased from Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, MN, USA). The β -lg powder contained 90.3 wt% protein (measured from Kjeldhal analysis: N 6.38) of which 97% was β -lg with variants A and B in approximately equal quantities. It contained 5 wt% moisture, 0.3 wt% fat, <1 wt% lactose, and 1.8 wt% ash (including 0.02 wt% Ca, 0.09 wt% K, 0.02 wt% Mg, 0.65 wt% Na and 0.51 wt% P, determined by atomic adsorption spectroscopy.. The WPI powder was purchased from Lactalis (Laval, France). It contained 95% protein on dry weight basis, of which 70% β -lg and 20% α -lac as determined by size exclusion chromatography. The powders were dissolved in Milli-Q water while stirring overnight. The same results were obtained for dialysed and non-dialysed solutions, whereas significant differences were found when 10mM NaCl was added. This means that the effect of the small amount of salt in the powders was negligible. The protein concentration was determined by UV absorption at 278 nm using extinction coefficients of $0.96 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and $1.05 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for β -lg and WPI, respectively.

Fractal whey protein aggregates were formed by heating salt-free WPI solutions at 80°C and neutral pH until the reaction was finished. Stable suspensions of fractal aggregates of two different sizes were obtained by heating protein solutions at $C=62 \text{ g/L}$ and $C=90 \text{ g/L}$, respectively. WPI microgels of two different sizes were obtained by heating WPI solutions at $C=40 \text{ g/L}$ at pH 5.8 and at pH 6.1, respectively. In all cases the amount of HCl or NaOH needed to set the pH was carefully recorded and used to calculate the effect on the charge density. The average molar mass (M_w) and hydrodynamic radius (R_h) were determined with static and dynamic light scattering using the same methodology as described by (Phan-Xuan et al. (2011)).

Titration experiments were conducted at room temperature using an automatic titrator (TIM 856, Radiometer Analytical) equipped with a combined pH electrode and a temperature probe. The pH electrode was calibrated by a three-point calibration using standard buffers. When the pH of protein solutions was checked with a different pH-meter and a different probe it was found to be the same within 0.05 units. The pH of all samples was first set to 8.0 by titration with a standard solution of NaOH (0.1M or 1M, depending on the protein concentration) and then titrated to pH 4 with a standard solution of HCl (0.1M or 1M). A number of protein solutions at set pH values close to the IIP were titrated with a 2M NaCl solution. Titrations were done at a rate of 0.1 mL per min, but no significant difference was observed when a lower rate was used.

The net charge density of the proteins as a function of the pH was deduced as follows. The number of H⁺ bound or released per protein was calculated from the volume of the added NaOH and HCl solutions (V):

$$\Delta\alpha = \frac{V(\text{HCl}) \times [\text{HCl}] - V(\text{NaOH}) \times [\text{NaOH}]}{m/M_w} \quad (1),$$

where m is the mass of titrated whey proteins, [HCl] and [NaOH] are the concentrations of the HCl and NaOH solutions and M_w is the average molar mass of the whey proteins (M_w= 1.75x10⁴ g/mol for WPI and 1.86x10⁴ g/mol for β-Ig). Notice that the amount of H⁺ in the water is negligible in the pH range covered in the experiment. The dependence of the pH on α was subsequently calculated by taking α=0 at the IIP:

$$\alpha = \Delta\alpha - \Delta\alpha(\text{IIP}) \quad (2).$$

Results

Native proteins

β-Ig solutions at C=10 g/L with different NaCl concentrations ([NaCl]) were titrated as described in the materials and methods and were found to cross at approximately pH 5, see fig. 1a. Crossing of the titration curves at a single value of the pH has earlier been reported for pure β-Ig (Cannan, Palmer and Kibrick, 1942), but also for egg ovalbumin (Cannan et al., 1941; Sørensen et al., 1927), lysozyme (Tanford et al., 1954) and, very recently, for soy globulin (Chen, Zhao, Chassenieux and Nicolai, 2016). However, Salis et al. (2011) observed that titration curves of BSA at different NaCl concentrations did not cross at exactly the same pH, which they attributed to non-electrostatic interactions. The effect of salt on α can be understood in terms of the surface potential of the proteins, which at a fixed pH decreases with increasing ionic strength (Salis et al., 2011). Therefore, for a given pH the net charge density will be larger when the ionic strength is higher. As a consequence, for a fixed charge density the pH decreases with increasing [NaCl] when it is above the IIP, increases when it is below the IIP and is expected to be independent of [NaCl] at the IIP.

In order to obtain a precise value of the IIP and to verify that the pH was truly independent of [NaCl] at the IIP, β-Ig solutions at different pH close to pH 5 were titrated with 2M NaCl, see fig. 1b. For pH≥5.2, the pH decreased with increasing [NaCl], whereas for pH≤4.8 it increased. At pH 5.0, the pH was practically independent of [NaCl] up to 0.1M and therefore we may conclude that IIP=5.0 for native β-Ig with an uncertainty of about ±0.1 pH

units. We repeated the titration with NaCl at pH 5.0 for $C=20$ g/L and again observed practically no effect on the pH, see the dashed line in fig. 1b. We did, however, observe a decrease of the pH for $[\text{NaCl}]>0.1\text{M}$ for all pH tested, even at pH 4.6, at which the pH increased up to $[\text{NaCl}]=0.1\text{M}$.

The value of the IIP found here is slightly smaller than that reported by Cannan et al. (1942) who found that titration curves of native β -lg at different KCl concentrations crossed at pH 5.2. Nozaki et al. (1959) determined the IIP by measuring the pH of a β -lg solution from which all ions other than H^+ or OH^- were removed and found in this way $\text{IIP}=5.4$. They observed that the pH decreased when they added KCl at this pH, which they attributed to the adsorption of K^+ . We also observed a decrease of the pH 5.4 when we added NaCl, but not at pH 5.0. Our results can be reconciled with those of Nozak et al. (1959) if they had not succeeded in removing all ions other than H^+ or OH^- . It is interesting to compare the IIP with the isoelectric point (IEP) that is defined as the pH at which the ζ -potential is zero. The two are not necessarily the same, because ions adsorbed to the proteins may lead to a finite ζ -potential at the IIP. A relatively precise value of the IEP of β -lg was obtained by isoelectric focusing and was found to be 5.2 (Fredriksson, 1975), i.e. when the net charge of the proteins is almost -1, but it would not be prudent to draw firm conclusions from such a small difference.

WPI solutions at $C=10\text{g/L}$ were titrated with HCl and NaCl in a similar manner as for β -lg solutions. We found for WPI that $\text{IIP}=4.9$, which is slightly lower than for pure β -lg. The dependence of the pH on the charge density was very close for WPI and pure β -lg for $\text{pH}>5.0$, but α was significantly smaller for WPI for a given pH at $\text{pH}<5.0$, see fig. 2. The WPI used for this study contained 20% α -lac with an $\text{IIP}\approx 4.8$ and 10% of other whey proteins. The proximity of the IIP of β -lg and α -lac together with the small quantity of other proteins explains why the pH-dependence on α is almost the same for WPI and pure β -lg.

The effect of the protein concentration on the dependence of the pH on α was investigated for WPI up to 137 g/L, see fig. 3. For $\alpha<0$ increasing the protein concentration led to a decrease of the pH, whereas for $\alpha>0$ it led to an increase. This is expected, because with increasing protein concentration the concentration of counterions is also increased, which has the same effect on the surface potential as adding NaCl. The effect of the protein concentration decreased when NaCl was added and disappeared altogether in the presence of

0.5M NaCl (results not shown), because the increase of the ionic strength with increasing protein concentration becomes small compared to that of the added salt.

Aggregates. Fractal aggregates and microgels of WPI of two different sizes were formed by heating as described in the material and methods section. Fractal aggregates were formed at pH close 7 the pH before and after heating was found to be the same within the experimental error. Microgels were formed at pH 6.1 and pH 5.8. In this case, after heating, the pH had increased to pH 6.4 and pH 6.1, respectively. An increase of the pH due to the formation of microgels has already been reported in the literature (Donato, Schmitt, Bovetto and Rouvet, 2009; Phan-Xuan et al., 2011) . The hydrodynamic radii were 165 nm and 35 nm for the larger and smaller fractal aggregates and 370nm and 100nm for the larger and smaller microgels, respectively. The aggregate solutions were titrated with HCl at different NaCl concentrations and with NaCl at different pH values in the same manner as the native protein solutions.

The dependence of the pH on α for the smaller microgels is shown in fig. 4a and the dependence of α on [NaCl] at different set pH values is shown in fig. 4b. Again we find that the titration curves cross approximately at the same pH. Titration with NaCl showed that IIP=5.1 (see fig. 4b), which is slightly larger than the value found for native WPI. The titration curves obtained for the larger microgels were the same within the experimental error as for the smaller microgels. Similar experiments for the fractal aggregates of WPI showed that IIP=5.0. Again the titration curves were the same for the two aggregate sizes.

Fig. 5 compares the dependence of the pH on α for the two types of aggregates with that for the native proteins at C=10 g/L in salt-free solutions (fig. 5a) and in the presence of 0.5M NaCl (fig. 5b). The dependence of the pH on the net charge density of the proteins is significantly different after denaturation and aggregation. It depends on the aggregate structure, but not on the aggregate size, which is expected since protonation of amino acids is influenced by their local environment. Connecting proteins into aggregates leads to a closer proximity of the charged groups of protein molecules and therefore stronger electrostatic interaction, which decreases their total charge density. Microgels are much denser than fractal aggregates even locally, which may explain why the influence of aggregation was strongest for the microgels. We note that very recently, Li, Zhao, Chen and Mercadé-Prieto (2016) compared titration curves of native and aggregated WPI between pH 7 and pH 13. They observed that deprotonation of the aggregates was the same as that of the native proteins aggregates up to pH 11, but less for pH>11. Over the small pH range where their results

overlap with our results (pH 7-8) we also find that deprotonation is the same for native proteins and aggregates. It was, however, not realized by Li et al. that the net charge density of the aggregates was significantly from that of the native proteins at pH 7.0.

The implication of having a lower net charge density for a given pH after aggregation is that for a given charge density the pH is higher. An increase of the pH after heating was indeed observed in the narrow pH range where microgels are formed as was reported in more detail elsewhere (Donato et al., 2009). The effect is less important in the presence of salt, see fig. 5b, because charge interaction is screened. For the same reason the effect is also weaker at higher protein concentrations. The effect of aggregation is smaller for fractal aggregates and in the presence of 0.5M NaCl the difference with native proteins is very small for pH>5.8. This explains why almost no change of the pH was observed when the proteins were heated at neutral pH and at relatively high protein concentrations.

As mentioned in the introduction, similar aggregates are formed by pure β -lg and WPI. In order to check whether the dependence of the pH on α was different for the two protein powders, we compared the dependence for fractal aggregates formed by β -lg and WPI. For both we found that IIP=5.0 and fig. 6 shows that the dependence of the pH on α is almost the same both without NaCl and at 0.5M NaCl.

Schmitt et al., 2009) studied the effect on the ζ -potential after formation of microgels by thermal aggregation of β -lg. They observed that the IEP shifted from 5.0 to 5.3 after aggregation. Morand, Guyomarc'h, Pezennec and Famelart (2011) found that the IEP of fractal whey protein aggregates was 4.7 in 0.1M NaCl. It appears as if the difference between the two aggregate morphologies is much larger for the IEP than for the IIP and that for microgels IEP>IIP and for fractal aggregates IEP<IIP. However, the IEP was determined in these studies by measuring the electrophoretic mobility at different pH and interpolation, which is not very accurate. It is quite possible that the differences between the IEP and the IIP are within the experimental error.

We have seen that α changes when the protein concentration is varied at fixed pH. This can have important implications for the interpretation of experimental results on pH-sensitive protein aggregation at different concentrations done at fixed pH and explains recently reported results on the aggregation of β -lg and of soy globulin. As was mentioned in the introduction, whether heat-denatured β -lg forms strands or microgels depends on the pH. However, in a detailed investigation of this phenomenon at different β -lg concentrations

Phan-Xuan et al. (2011) observed that the critical pH at which the transition occurs shifted to higher pH with decreasing protein concentration. The critical pH below which microgels started to be formed shifted from pH 6.5 at $C=10$ g/L to pH 6.3 at $C=40$ g/L. In view of the results presented here, the shift can be explained by the fact that the transition is controlled not by a critical pH, but by a critical α and the pH at the critical value of α increases with decreasing protein concentration. This was already discussed elsewhere (Phan-Xuan et al., 2014) and it was concluded that the critical net charge density of the native proteins below which microgels are formed is approximately -5. However, it was not realized that the charge density increases at fixed pH for lower protein concentrations.

Very recently, self-assembly of native soy globulin into fractal aggregates was investigated as a function of the pH and the protein concentration (Chen et al., 2016). Erratic non monotonous concentration dependence was observed if the aggregate size was plotted as a function of the protein concentration at fixed pH. However, when the same results were plotted as a function of α determined in the same manner as was done here, the aggregate size increased in a coherent manner with increasing concentration.

Conclusions

At the isoionic points of native WPI (4.9) and native β -lactoglobulin (5.0), the pH is independent of the NaCl concentration up to 0.1M, but decreases weakly at higher salt concentrations. The pH dependence of the net charge density of native WPI and native β -lg is very close for $\text{pH} > 5.0$. Heat-induced aggregation of WPI and pure β -lg leads to a small increase of the IIP by at most 0.2 pH units in comparison to the native proteins. For $\text{pH} > \text{IIP}$, the pH dependence on α is slightly stronger after aggregation so that for a given pH the net charge density of the proteins is smaller after aggregation. The effect of aggregation on the pH is less for fractal aggregates than for microgels, but does not depend on the aggregate size. The effect also decreases when salt is added or the protein concentration is increased. If aggregation processes are sensitive to small changes of α , the effect of the protein concentration and the ionic strength is easier to understand if α is kept constant instead of the pH.

Acknowledgement A.K. acknowledges financial support of the regional research program PROFIL of the Pays de la Loire and Bretagne.

References

- Amin, S., Barnett, G. V., Pathak, J. A., Roberts, C. J. & Sarangapani, P. S. (2014), Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **19**, 438-449.
- Bryan, W. P. (1978), The isoionic point of amino acids and proteins, *Biochemical Education*, **6**, 14-15.
- Cannan, R. K. (1942), The Acid-Base Titration of Proteins, *Chemical Reviews*, **30**, 395-412.
- Cannan, R. K., Kibrick, A. & Palmer, A. (1941), The amphoteric properties of egg albumin, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **41**, 243-266.
- Cannan, R. K., Palmer, A. H. & Kibrick, A. C. (1942), The hydrogen ion dissociation curve of β -lactoglobulin, *Journal of Biological Chemistry*, **142**, 803-822.
- Chen, N., Zhao, M., Chassenieux, C. & Nicolai, T. (2016), Structure of Self-assembled Native Soy Globulin in Aqueous Solution as a Function of the Concentration and the pH *Food Hydrocolloids*, **56**, 417-424.
- Clark, A. H., Kavanagh, G. M. & Ross-Murphy, S. B. (2001), Globular protein gelation--theory and experiment, *Food Hydrocolloids*, **15**, 383-400.
- De Wit, J. (1998), Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products, *Journal of dairy science*, **81**, 597-608.
- Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L. & Rouvet, M. (2009), Mechanism of formation of stable heat-induced β -lactoglobulin microgels, *International Dairy Journal*, **19**, 295-306.
- Fredriksson, S. (1975), Scanning isoelectric focusing in small density-gradient columns: IV. The use of deuterium oxide for preparing the density gradient and its effects on isoelectric points of proteins, *Journal of Chromatography A*, **108**, 153-167.
- Guyomarc'h, F., Famelart, M.-H., Henry, G., Gulzar, M., Leonil, J., Hamon, P., Bouhallab, S. & Croguennec, T. (2014), Current ways to modify the structure of whey proteins for specific functionalities—a review, *Dairy Science & Technology*, 1-20.
- Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer, L. (2004), Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function, *Journal of dairy science*, **87**, 785-796.
- Krebs, M. R. H., Devlin, G. L. & Donald, A. M. (2007), Protein particulates: another generic form of protein aggregation?, *Biophysical journal*, **92**, 1336-1342.
- Langton, M. & Hermansson, A. (1992), Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH, *Food Hydrocolloids*, **5**, 523-539.
- Li, H., Zhao, L., Chen, X. D. & Mercadé-Prieto, R. (2016), Swelling of whey and egg white protein hydrogels with stranded and particulate microstructures, *International journal of biological macromolecules*, **83**, 152-159.
- Longworth, L. & Jacobsen, C. (1949), An Electrophoretic Study of the Binding of Salt Ions by β -Lactoglobulin and Bovine Serum Albumin, *The Journal of Physical Chemistry*, **53**, 126-134.
- Mezzenga, R. & Fischer, P. (2013), The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions, *Reports on Progress in Physics*, **76**, 046601.
- Morand, M., Guyomarc'h, F., Pezenec, S. & Famelart, M.-H. (2011), On how κ -casein affects the interactions between the heat-induced whey protein/ κ -casein complexes and the

- casein micelles during the acid gelation of skim milk, *International Dairy Journal*, **21**, 670-678.
- Nicolai, T., Britten, M. & Schmitt, C. (2011), β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications, *Food Hydrocolloids*, **25**, 1945-1962.
- Nicolai, T. & Durand, D. (2013), Controlled food protein aggregation for new functionality, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **18**, 249-256.
- Nozaki, Y., Bunville, L. G. & Tanford, C. (1959), Hydrogen Ion Titration Curves of β -Lactoglobulin1, *Journal of the American Chemical Society*, **81**, 5523-5529.
- Phan-Xuan, T., Durand, D., Nicolai, T., Donato, L., Schmitt, C. & Bovetto, L. (2011), On the Crucial Importance of the pH for the Formation and Self-Stabilization of Protein Microgels and Strands, *Langmuir*, **27**, 15092-15101.
- Phan-Xuan, T., Durand, D., Nicolai, T., Donato, L., Schmitt, C. & Bovetto, L. (2014), Heat induced formation of beta-lactoglobulin microgels driven by addition of calcium ions, *Food Hydrocolloids*, **34**, 227-235.
- Salis, A., Boström, M., Medda, L., Cugia, F., Barse, B., Parsons, D. F., Ninham, B. W. & Monduzzi, M. (2011), Measurements and theoretical interpretation of points of zero charge/potential of BSA protein, *Langmuir*, **27**, 11597-11604.
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuilliomenet, A.-M., Rouvet, M., Bovetto, L., Barbar, R. & Sanchez, C. (2009), Multiscale characterization of individualized β -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions, *Langmuir*, **25**, 7899-7909.
- Sørensen, S., Linderstrøm-Lang, K. & Lund, E. (1927), The influence of salts upon the ionisation of egg albumin, *The Journal of general physiology*, **8**, 543-599.
- Tanford, C. & Wagner, M. L. (1954), Hydrogen Ion Equilibria of Lysozyme1, 2, *Journal of the American Chemical Society*, **76**, 3331-3336.
- van der Linden, E. & Foegeding, E. A. (2009), Gelation: principles, models and applications to proteins, *Modern biopolymer science. Academic, San Diego*, 29-91.

Article 3: Polymer diffusion in globular protein gels and aggregate suspensions.

Published in *Journal of Physical Chemistry B*, 2018, 8075–8081.

Walailuk Inthavong, Taco Nicolai, Christophe Chassenieux

LUNAM Université du Maine, IMMM UMR-CNRS 6283, Polymères, Colloïdes et Interfaces, 72085 Le Mans cedex 9, France

Abstract

FRAP was used to study self diffusion of fluorescently labeled dextran chains in aqueous solutions of whey protein isolate (WPI) at neutral pH before and after heating over a wide range of concentrations ($C = 10 - 260$ g/L). Heating caused irreversible aggregation of WPI leading to the formation of aggregates that increased in size with increasing concentration (C) and gels above $C_g = 110$ g/L. The results were compared to the concentration dependence of the zero-shear viscosity (η), the gel stiffness, the osmotic compressibility and the dynamic correlation length. Brownian diffusion of the probes was observed in aggregate suspensions as well as in weak gels formed just beyond C_g . The diffusion coefficient (D) decreased with increasing C , but the dependence was much weaker than that of η . At higher concentrations densely crosslinked gels were formed, which caused a strong decrease of the mobility of dextran chains. For these systems recovery of the fluorescence was logarithmic with time suggesting an exponential distribution of diffusion coefficients. Diffusion of dextran chains was also investigated as a function of the protein concentration for suspensions of three types of WPI aggregates: small strands, fractal aggregates and homogeneous microgels.

Introduction

Globular proteins have a compact well-defined structure that is rather rigid at room temperature, but when the temperature is increased close to or above the denaturation temperature the mobility of the segments increases, which often allows formation of strong bonds between the proteins. This leads to formation of aggregates that resist cooling and dilution. The process of heat-induced aggregation and gelation of globular proteins has been studied in most detail for whey proteins and in particular its principal component β -lactoglobulin (β -lg) ¹⁻⁴. In a first step aggregates are formed with different structures

depending on the conditions of heating such as the pH and the type and concentration of added salt. In a second step random association of these elementary units leads to formation of self-similar aggregates characterized by a power law dependence between the molar mass (M) and the radius (R) of the aggregates: $R \propto M^{d_f}$. The exponent d_f is called the fractal dimension and is most often about two. The size of the aggregates increases with heating time until it reaches a steady state value that increases with increasing protein concentration. The aggregates percolate into a system spanning network causing gelation above a critical protein concentration that depends on the heating conditions and the type of protein.

At neutral pH, the elementary unit consists of small strand-like aggregates formed with a z-average hydrodynamic radius (R_h) 15-20 nm^{5, 6}. Above about 60 g/L these strands further assemble into fractal aggregates of which the size at steady state increases until at $C_g \approx 100$ g/L a gel is formed. At these conditions, strong electrostatic repulsion between the proteins causes the osmotic compressibility of the suspensions to decrease with increasing protein concentration even though the aggregate size increases⁷. For this reason, solutions and gels formed at neutral pH in salt free aqueous solutions are transparent at all concentrations. When native β -Ig or WPI is heated at a pH close to its isoionic point or in the presence of a small amount of CaCl_2 stable suspensions of homogeneous microgels can be formed⁸.

The properties of stable dense suspensions of globular protein aggregates have not been investigated much. Recently, we reported on a study of the flow properties of dense suspensions of fractal aggregates with different sizes⁷. The viscosity (η) was found to increase initially exponentially with increasing protein concentration:

$$\eta = \eta_0 \exp(C/C_c) \quad 1$$

where η_0 is the viscosity of water and C_c is a characteristic protein concentration that was found to increase with increasing aggregate size. C_c was compared to the overlap concentration of the aggregates (C^*) calculated as:

$$C^* = 3M_w / (4\pi R^3 N_a) \quad 2$$

with M_w the weight average molar mass, N_a Avogadro's number and R either R_h or the z-average radius of gyration (R_g). R_h was found to be proportional to R_g , but systematically smaller, which is expected for polydisperse systems. The dependence of C_c on M_w was found to be intermediate between that of C^* calculated using R_g and R_h . The results were explained by increasing polydispersity of the aggregates with increasing size and interpenetration of the aggregates. The latter was demonstrated by light scattering measurements that showed that the

apparent molar mass (M_a), which is proportional to the osmotic compressibility, reached the same values at high concentrations independent of the aggregate size.

Results on fractal aggregates were compared with those obtained with homogeneous microgels with $R_h = 160$ nm formed by the same proteins by heating in the presence of a small amount of CaCl_2 . The viscosity of microgel suspensions increased more weakly with increasing C compared to fractal aggregates with the same size, because microgels are much denser and therefore take up less space at a given C . However, when η was plotted as a function of the volume fraction the increase of η was steeper for microgels than for fractals, because the microgels cannot interpenetrate.

The important effect of size and shape of protein aggregates on the viscosity will be reflected in the mobility of tracer molecules in these media. If the tracers are rigid and large compared to the characteristic length scale of concentration fluctuations of the medium their diffusion coefficient (D) will be simply proportional to the viscosity. However, if their size is comparable or smaller, D will depend on the structure and mobility of the aggregates. Phillies⁹ reviewed in detail experimental results on tracer diffusion in complex liquids and gels, while theoretical developments have been reviewed by Amsden et al.¹⁰ and Masaro et al.¹¹ More recently, De Korte et al.¹² reviewed results for probe diffusion in matrices food biopolymers such as milk protein suspensions and gels.

Diffusion of flexible polyethylene oxide (PEO) and dextran chains has been studied in heat-set gels of β -lg^{13, 14} and whey protein isolate (WPI)^{15, 16}. As expected, the diffusion coefficient relative to that in water (D_r) decreased with increasing protein concentration and increasing size of the polymers probes. The probes diffused more slowly in gels than in native protein solutions at the same concentration, except in gels formed at high ionic strength that were very heterogeneous. In homogeneous gels formed by heating proteins in salt free water at neutral pH diffusion of a significant fraction of the tracers became extremely slow.

As far as we are aware, diffusion of trace polymers has not yet been investigated in suspensions of globular protein aggregates. Here we investigate the diffusion of dextran in suspensions of protein aggregates formed by heating aqueous solutions of WPI using confocal laser scanning microscopy (CLSM) combined with fluorescence recovery after photo bleaching (FRAP). The WPI used for this study contained mostly β -lg, but also a small amount of other globular proteins, mainly α -lactalbumin. Heat-induced aggregation and gelation WPI is very similar to that of purified β -lg, but is more relevant for practical applications. We will first show results for D_r in WPI suspensions that were extensively

heated at different concentration both below and above the gel concentration. Then we will look at the effect of varying the concentration of aggregates with different size and shape.

Materials and Methods

Whey protein isolate (L4S-00003) was purchased from Nestlé-CRB (Lausanne, Switzerland). The protein content was consisted of 65 % β -lg, 20 % α -lac, and 15 % other whey proteins and a small amount of caseins. The powder was dissolved by stirring overnight in Milli-Q water with 200 ppm NaN_3 to protect against bacterial growth. A small fraction (<5%) of large aggregates was removed by centrifugation at room temperature with an Allegra 64R centrifuge (Beckman Coulter, USA) at 5×10^4 G for 2 h. For light scattering measurements, the protein solutions were filtered through 0.2 μm pore size filters (Anatope). The protein concentration was determined after filtration by UV absorption at 278 nm using for the extinction coefficient $\varepsilon=1.01 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Suspensions of WPI aggregates were prepared by heating native WPI at pH 7.0 at 80 °C during 24 h. Fractal aggregates of different sizes were prepared by heating salt free solutions at different protein concentrations, whereas microgels were prepared at $C = 40 \text{ g/L}$ in the presence of 4.8 mM CaCl_2 . If needed the concentration of aggregates was increased by ultrafiltration utilizing a Krosflo Research II/i/Tangential Flow Filtration (TFF) System (Spectrum Europa B.V.) with membrane with cut-off pore size $3 \times 10^3 \text{ Da}$.

Fluorescein IsoThioCyanate (FITC)-labeled dextran chains with nominal molar masses $7 \times 10^4 \text{ g/mol}$ (D_{70}) and $5 \times 10^5 \text{ g/mol}$ (D_{500}) were purchased from Sigma-Aldrich.

Light scattering. Static and dynamic light scattering measurements were done as described in more detail elsewhere⁷ using an ALV-5000 digital correlator in combination with a laser emitting vertically polarized light at $\lambda = 632 \text{ nm}$ (ALV-Langen). The relative excess scattering intensity (I_r) was determined as the total intensity minus the solvent scattering divided by the scattering of toluene. I_r is related to the osmotic compressibility ($(d\pi/dC)^{-1}$) and the z-average structure factor ($S(q)$):

$$I_r = K.C.R.T.(d\pi / dC)^{-1}S(q) \quad 1$$

with R the gas constant, T the absolute temperature, q the scattering wave vector and K an optical constant that depends on the refractive index increment. In dilute solutions and in the limit of $q \rightarrow 0$, I_r/KC is equal to the weight average molar mass (M_w). At finite concentrations

we measure an apparent molar mass (M_a) that is proportional to the osmotic compressibility. In the gels part of the concentration fluctuations were frozen rendering the systems non-ergodic. In this case the spatial average of the intensity was determined by slowly rotating the sample.

The cooperative diffusion coefficient (D_c) was determined using dynamic light scattering were determined as described elsewhere⁷. An apparent hydrodynamic radius (R_a) was calculated using the Stokes - Einstein equation:

$$D_c = \frac{kT}{6\pi\eta R_a} \quad 2$$

with k the Boltzman constant. In dilute solutions D_c equals the z-average self diffusion coefficient from which the z-average hydrodynamic radius (R_{hz}) is obtained.

Rheology. The zero shear viscosity of native and heated WPI solutions determined using a rheometer (AR2000, TA Instruments) as described elsewhere⁷ using a cone - plate geometry (diameter 40 mm, angle 0.58°) and a Couette geometry. The imposed stress was chosen within the linear response regime. For gel forming systems, in-situ measurements of the oscillatory shear moduli were made as a function of heating time at an oscillation frequency of $f = 0.1$ Hz. The solutions were loaded onto the geometry at room temperature and the geometry was covered with paraffin oil to prevent water evaporation. Subsequently, the temperature was increased to 80 °C using a Peltier system at the maximum rate (exceeding 20 °C per minute) and the storage and loss moduli were determined as a function of time.

Fluorescence recovery after photobleaching. For FRAP measurements solutions of native WPI containing 0.3 g/L fluorescently labeled dextran chains were inserted between a sealed concave slide and a coverslip and heated during 24 h at 80 °C. Alternatively, dextran probes were added to separately prepared WPI aggregate suspensions and subsequently inserted between a concave slide and a coverslip. The measurements were carried out at 20°C as described in detail elsewhere¹³ with a confocal laser scanning microscope (Leica TCS-SP2, Leica Microsystems Heidelberg, Germany or Zeiss LSM800, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). It was verified that the diffusion coefficient of the dextran was independent of the dextran concentration at the low concentrations used here.

Results

Suspensions and gels heated at different concentrations

WPI solutions were rapidly heated to 80 °C at different concentrations between 10 g/L and 260 g/L and subsequently kept at 80 °C while measuring the storage shear modulus (G') at $f = 0.1$ Hz, see fig. 1a. Gelation was characterized by a sharp increase of G' that became larger than G'' and observed above the gel concentration $C_g \approx 110$ g/L. The rate of gelation increased with increasing protein concentration and for $C > 160$ g/L the systems gelled even before the temperature had reached 80 °C. The values of G' that were reached after 1 h heating are plotted in fig. 1b. and shows a strong increase with increasing protein concentration. Stable aggregate suspensions were formed by heating native WPI solutions at $C < C_g$ during 24 h at 80 °C, which was sufficient to reach steady state. The relative viscosity (η_r) of the suspensions increased sharply with increasing concentration close to C_g , see fig. 1b. The divergence of η_r at C_g was caused by the divergence of the aggregate size as was discussed elsewhere⁷.

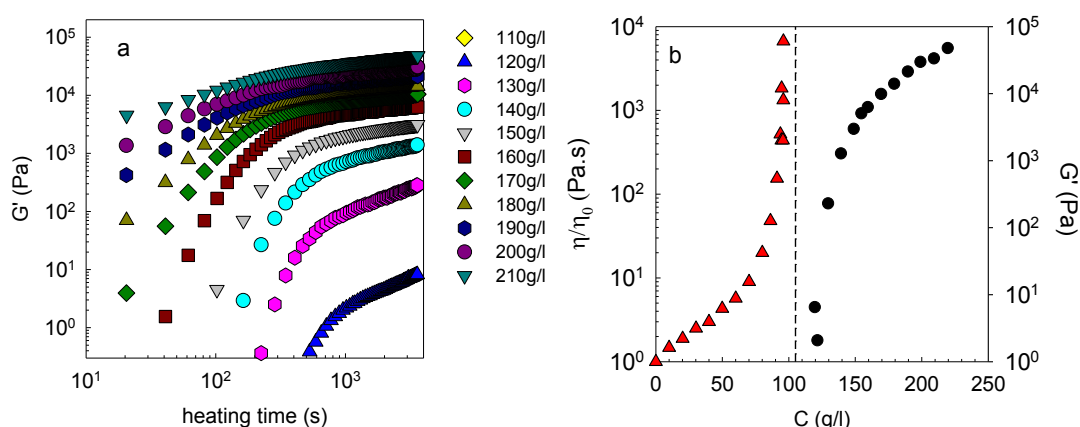


Fig. 1a Dependence of the storage shear modulus at 0.1 Hz on heating time for WPI solutions at different protein concentrations.

Fig. 1b Concentration dependence of η_r for WPI aggregate suspensions at steady state formed at $C < C_g$ and of G' at 0.1 Hz for gels formed at $C > C_g$. C_g is indicated by the dashed line

The structure of the aggregate solutions and the gels was characterized by static and dynamic light scattering as described elsewhere⁷. The scattered light intensity was found to be independent of the scattering wave vector and an apparent molar mass (M_a) was calculated. M_a is proportional to the osmotic compressibility ($dC/d\pi$): $M_a = RT(dC/d\pi)$ ¹⁸ and was found to decrease approximately exponentially with increasing protein concentration up to $C = 120$ g/L, see fig. 2a, which was caused by strong electrostatic repulsion. However, M_a remained constant at higher concentrations when gels were formed. We believe that this is caused by a

contribution of elastic forces that cause frozen concentration fluctuations in the network which off-set the increasing order induced by electrostatic repulsion. The apparent hydrodynamic radius (R_a) was determined by DLS for $C < C_g$ and was found to decrease from 20 nm at $C = 12$ g/L to about 7 nm at $C > 70$ g/L, see fig. 2b. R_a characterizes the length scale beyond which hydrodynamic interactions are screened by the presence of other particles¹⁹.

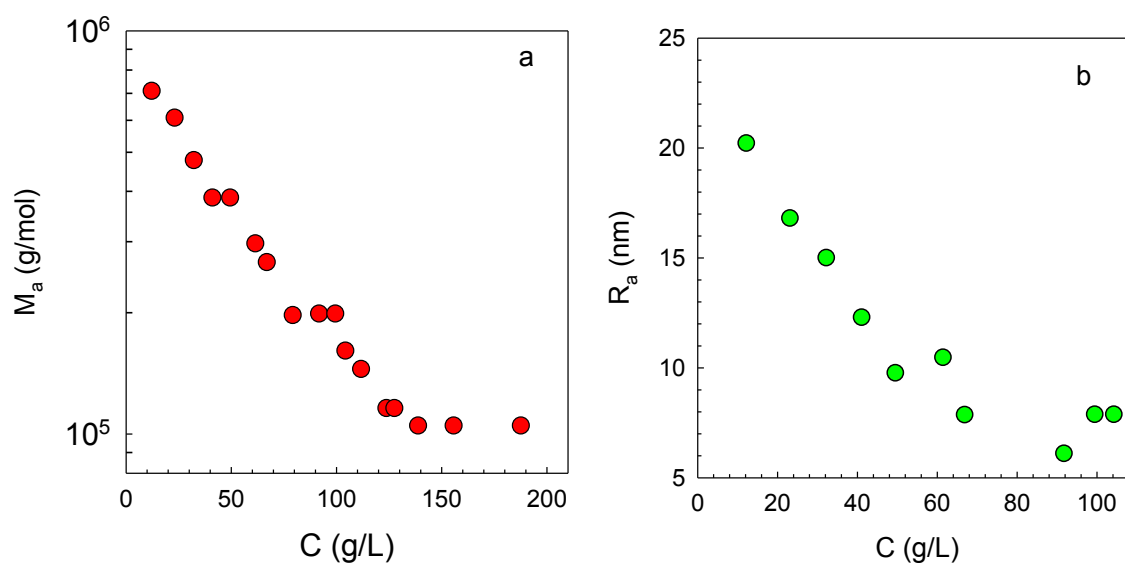


Fig.2 Apparent molar mass (a) and hydrodynamic radius (b) of WPI suspensions and gels as a function of the concentration at which they were heated.

FRAP measurements were done on WPI solutions that were heated at 80 °C for 24 h in the presence of a small quantity (0.3 g/L) of fluorescently labeled dextran D_{500} . The z-average diffusion coefficient of D_{500} determined by DLS in pure water was 9.8×10^{-12} m/s², whereas the weight average value determined from FRAP was 1.5×10^{-11} m/s². The corresponding z-average and weight average hydrodynamic radii are $R_{hz} = 22$ nm and $R_{hw} = 14$ nm, respectively. The difference between the two values is caused by size dispersity of the dextran sample. Figure 3 shows examples of the fluorescence intensity (I_f) profiles of the bleached area with radius $w = 15$ μ m at different times after bleaching. The results at $C = 30$ g/L are typical for aggregate suspensions, whereas the results at $C = 150$ g/L are typical for gels. For suspensions the initial square profile quickly transformed into a Gaussian profile as is expected for simple Brownian diffusion. For gels, however, the square profile persisted even though the depth of the well decreased. Similar observations were reported elsewhere for dextran diffusion in β -lg gels produced at the same conditions¹³. An intermediate behavior

was found at $C = 120$ g/L for which we observed initially square profiles with a decreasing depth and later Gaussian profiles.

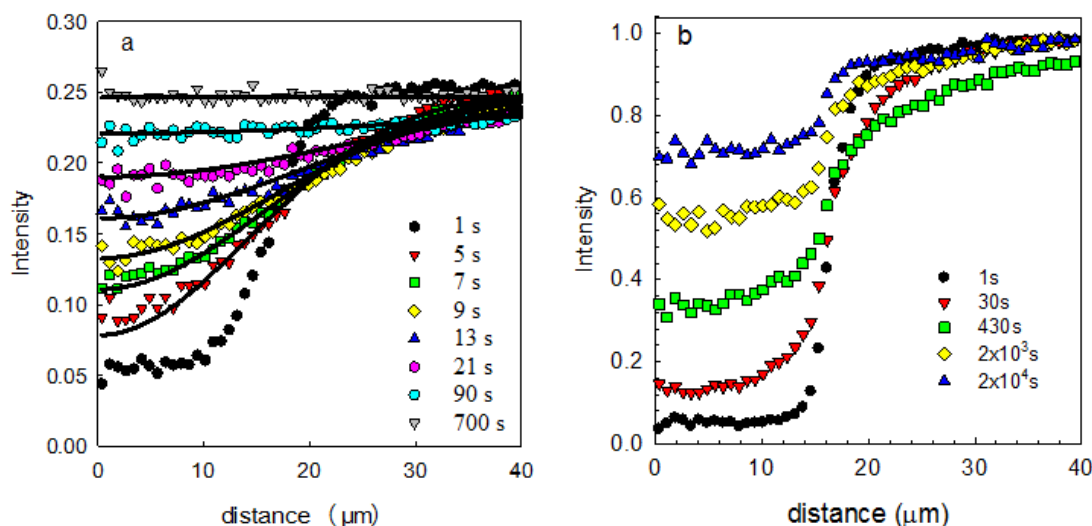


Fig.3 Intensity profiles as a function of the distance to the center of a bleached area with radius of $15 \mu\text{m}$ at different times after bleaching. Fig. 3a shows results for dense aggregate suspensions formed by heating at $C = 30$ g/L, whereas fig. 3b shows results for results for gels formed by heating at $C = 150$ g/L. In both cases the D_{500} was used as the probe. The solid lines in fig. 3a are fits to a Gaussian profile.

For systems that showed Gaussian profiles, the probe diffusion coefficient was determined by analyzing the time dependence of the intensity of all the pixels in the image using a method based on maximum entropy calculation as described in detail elsewhere²⁰. The diffusion coefficient of the dextran probes was determined as a function of the C up to $C = 120$ g/L and normalized by that in water, fig. 4. The relative diffusion coefficient (D_r) decreased more strongly with increasing C after heating implying that the friction felt by the dextran chains is stronger when the proteins have aggregated. If the medium acts as a continuous viscous medium the concentration dependence of D_r is the same as that of η_r^{-1} , see eq. 2. However, the concentration dependence of D_r was found to be much weaker than that of η_r shown in fig. 1b. A weaker dependence of D_r on C compared to that of η_r was also observed for native WPI. Clearly, the mobility of dextran chains with $R_{\text{hw}}=14$ nm is not determined by the macroscopic viscosity of the medium either before or after heating.

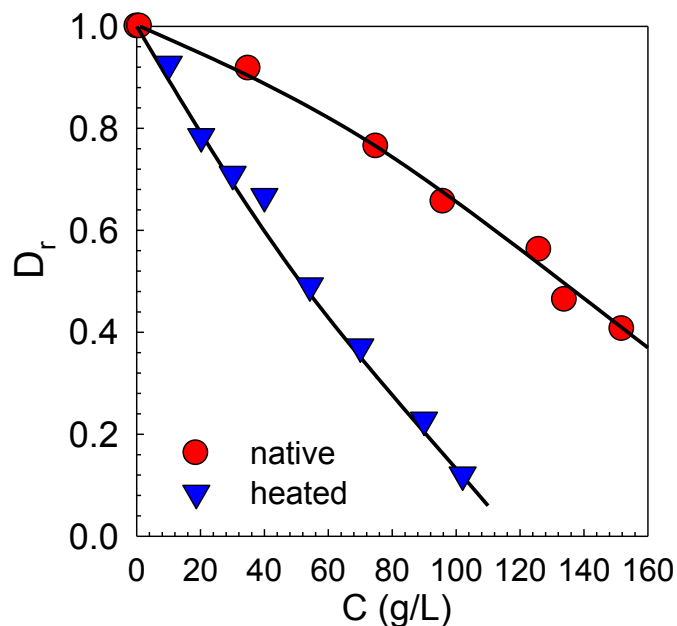


Fig.4 Comparison of the protein concentration dependence of the relative diffusion coefficient for D_{500} in suspensions of native WPI and fractal aggregates formed by heating.

The diffusion coefficient of D_{500} in the gels could not be determined reliably, because the profiles were not Gaussian. The anomalous probe diffusion in the gels is also clear from the recovery with time of the relative fluorescence intensity: $F(t) = (I(t)-I(0))/(I(\infty)-I(0))$ shown in fig. 5. $F(t)$ corresponds to the fraction of bleached dextran chains that have exchanged with unbleached chains from the medium surrounding the bleached area. For the suspensions $F(t)$ could be well described by the equation derived for a simple diffusion process of the probes²¹:

$$F(t) = \exp(-2\tau/t)[I_0(2\tau/t)+I_1(2\tau/t)], \quad 3$$

where $\tau = D/4w^2$ is the characteristic time needed to diffuse out of the bleached area with radius r and I_0 and I_1 are Bessel functions. We note that the values of D obtained from fits of F to eq. 3 were systematically somewhat smaller than those obtained from the analysis of all the pixel intensities as a function of time. However, in the gels the recovery at long times was logarithmic with time. The fraction of f that recovered logarithmically increased with increasing protein concentration. For $C > 140$ full recovery was not reached within one day for $w = 15 \mu\text{m}$. Nevertheless, measurements with different radii of the bleached area could be superimposed by multiplying t with w^2 , which means that the driving force for recovery is in all cases Brownian diffusion. The strong slow down of an increasing fraction of f with

increasing C had already been noted for dextran probes in β -lg gels¹³, but measurements had not been done over sufficiently long time scales to determine the logarithmic dependence.

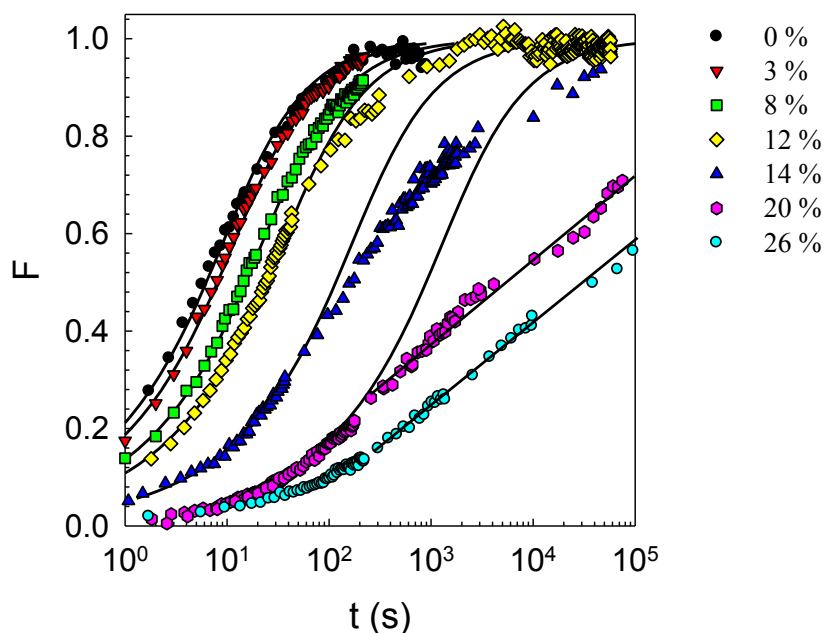


Fig.5 Recovery of the normalized fluorescence intensity after bleaching for aggregate suspensions and gels of WPI at different concentrations containing D_{500} . The solid lines represent fits to eq.3.

Dextran chains can move in the protein network even if the pore size of the network is smaller than the diameter of the chains, because they are flexible and can diffuse by reptation. However diffusion by reptation decreases strongly with decreasing pore size and increasing length of the dextran chains. The fact that the fluorescence profiles remain constant and that the intensity recovers logarithmically implies a hierarchical distribution of the mobility of the dextran chains, i.e. a fraction of dextran chains exchanges fully before the next fraction exchanges. We speculate that this behavior is caused by the dispersity in size and branching of the dextran probes. With increasing C the average pore size of the network decreases and a larger fraction of dextran chains can only diffuse via a reptation process so that the logarithmic time dependence of the recovery starts at lower F .

Here we have looked at the diffusion of dextran chains in homogeneous protein gels formed in salt free solutions. However, the mobility of probes is highly dependent on the distribution of the connected obstacles. This has been demonstrated elsewhere by a systematic study of diffusion of dextran chains in heat-set gels of β -lg formed at different ionic

strengths¹³. With increasing ionic strength the gels become increasingly heterogeneous leading to an increase of D_r . In very heterogeneous gels formed at high ionic strength, D_r was even larger than in solutions of native proteins at the same concentration even though in the former case the obstacles were immobile and the latter they were much more mobile than the probes. A small increase of D_r was also observed for PEO chains with different size in WPI solutions after the latter had formed a gel in the presence of 0.1 M NaCl¹⁶.

Suspensions at different concentrations with fixed aggregate size and shape

Fractal aggregates. For WPI suspensions formed by heating at different C below C_g , D decreased with increasing C both because the aggregate size increased and because the protein concentration increased. In order to disentangle these two effects, we have studied the effect of varying C on D_r for suspensions of aggregates with fixed size and shape. Fractal aggregates with $R_{hz} = 20$ nm and $R_{hz} = 117$ nm were formed as described in the Materials and Methods. The concentration dependence of M_a and R_a for suspensions of fractals with different sizes was reported elsewhere⁷, and was found to decrease with increasing concentration due to strong repulsive electrostatic interaction. For $C > 60$ g/L, M_a and R_a were approximately independent of the fractal size and correspond to the values found after heating at different C .

Fig. 6a compares the concentration dependence of D_r for D_{500} in suspensions of the fractal aggregates with that in native WPI. As expected, D_r was much smaller in suspensions of large fractals than in suspensions of native WPI and was intermediate in suspensions of small fractals. These results clearly demonstrate the importance of the mobility of the obstacles that inhibit dextran diffusion. Although the viscosity of the suspensions is also determined by the mobility of the native and aggregated proteins the concentration dependence of D_r is much weaker than that of η_r as we noted above for systems that were heated at different concentrations. It demonstrates that one cannot consider the protein suspension as a continuous viscous medium for the dextran chains.

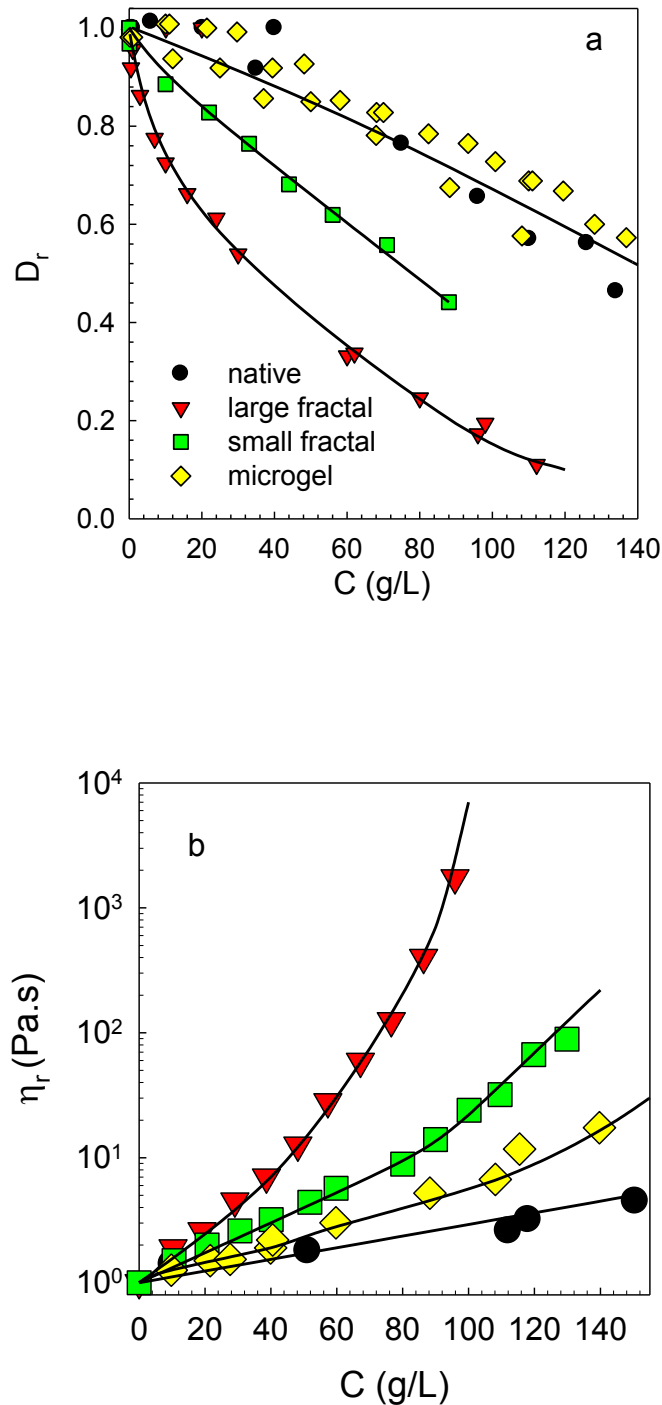


Fig.6 Concentration dependence of the relative diffusion coefficient for D_{500} in suspensions of native WPI, strands, fractals and microgels. The relative viscosity of the suspensions is shown in fig. 6b. Lines are guides to the eye.

The observed concentration dependence of D_r in suspensions of small and large fractals can be used to explain D_r in suspensions formed by heating at different C . When native proteins are heated at different concentrations up to about $C = 60$ g/L small fractals

with approximately the same size are formed⁷. Dextran chains are not charged and move between these fractals that have a smaller hydrodynamic radius than D_{500} and are quite mobile. Therefore, D_r of the samples heated at different C will be close to that of the small fractals at different C up to $C \approx 60$ g/L. When the protein concentration is increased further, small aggregates associate further into larger fractals that increase in size with increasing concentration⁷. Strong electrostatic repulsion causes a local order with a preferred distance between protein strands almost independent of the aggregate size for $C > 60$ g/L. The local order increases with increasing concentration, but is independent of the extent to which the strands are connected into larger fractal aggregates. For this reason M_a and R_a are independent of the size of the fractals for $C > 60$ g/L. However, the mobility of the fractals is, of course, strongly dependent on their size. As a consequence the mobility of the dextran probes in suspensions of larger fractals is much lower than in suspensions of small fractals at a given protein concentration. The strong decrease of D_r with increasing C in protein suspensions heated at different concentrations is therefore caused by the combined effects of increasing obstacle concentration and decreasing mobility of the obstacles.

Measurements were repeated with a smaller dextran probe (D_{70}) with $R_{hz} = 6.5$ nm and $R_{hw} = 6.0$ nm as determined by DLS and FRAP, respectively. Fig 7 shows that in suspensions of large fractals D_r was larger for the smaller probe, but it was almost the same for the two probes in suspensions of small fractals. We speculate that the friction of dextran chains with small mobile fractals is determined by the unperturbed radius the dextran chains so that the relative influence on the diffusion coefficient is the same. In suspensions of large fractals dextran chains need move between much more slowly moving obstacles, which is more difficult for larger chains.

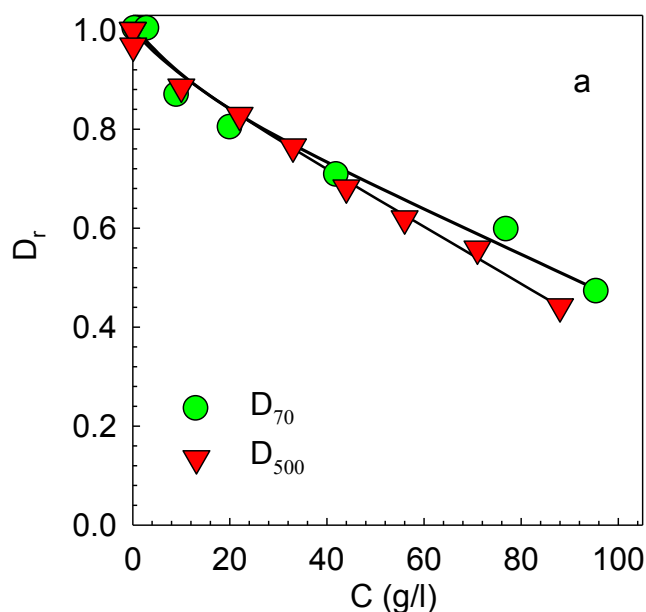


Fig.7 Concentration dependence of D_r for two different dextran probes in suspensions of small (a) or large fractals (b)

Microgels. Homogeneous WPI microgels with $R_{hz} = 107$ nm were produced as described in the materials and methods section. Fig. 6a shows that the concentration dependence of D_r was much weaker in suspensions of microgels than in suspensions of fractal aggregates with approximately the same size. In fact, it was even weaker than in suspensions of much smaller fractals and close to that of native WPI. These results show that the manner in which the proteins are connected is important for probe diffusion. Microgels are much denser than fractal aggregates of the same size. Ignoring polydispersity, the overlap concentration calculated as $C^* = 3M_w/(N_a 4\pi R_{hz}^3)$ with N_a Avogadro's number is $C^* = 11$ g/L for the fractals and $C^* = 300$ g/L for the microgels. This means that in the concentration range covered in this study the dextran chains can move between the microgels and do not need to penetrate them, whereas they are forced to penetrate the fractals. The effects of assembling native proteins into microgels are that both the number of obstacles and their mobility is strongly reduced. Apparently these two effects compensated each other so that approximately the same weak dependence of D on C was found for microgels as for native proteins. Large differences between D in suspensions of native WPI and microgels are, of course, expected at concentrations close to and beyond the overlap concentration of the microgels.

Conclusion

The mobility of flexible polymer chains in dense suspensions of protein aggregates depends both on the size and the morphology of the latter. Diffusion of dextran chains is faster in suspensions of small fractals than in suspensions of large fractals because the latter obstacles move more slowly. Probe diffusion in suspensions of dense microgels is much faster than in suspensions of fractal aggregates with the same size, because the latter obstacles are less dense and occupy more space at the same protein concentration. The effect of the difference in density between fractals and microgels on probe diffusion is very important and probe diffusion is even slower in suspension of fractals even if they are much smaller than the microgels. The concentration dependence of the diffusion coefficient of the probes is weaker than that of the viscosity of the suspensions, because the suspensions cannot be considered as a continuous medium on the relevant length scales. In addition, dextran chains are flexible and can diffuse move via a reptation motion.

When WPI is heated in water at pH 7 at increasing protein concentration both the size and the concentration of aggregates increases. As a consequence their mobility is reduced by accumulation of these two effects. Gels are formed above a critical concentration. With increasing crosslink density of the gels diffusion of an increasing fraction of the dextran chains characterized by increasingly broader distribution of diffusion coefficients. As a consequence the recovery of the fluorescence intensity after bleaching of the gels becomes logarithmic with time.

References

1. Nicolai, T.; Britten, M.; Schmitt, C. [beta]-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids* **2011**, 25, 1945-1962.
2. Amin, S.; Barnett, G. V.; Pathak, J. A.; Roberts, C. J.; Sarangapani, P. S. Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2014**, 19, (5), 438-449.
3. Brodkorb, A.; Croguennec, T.; Bouhallab, S.; Kehoe, J. J., Heat-Induced Denaturation, Aggregation and Gelation of Whey Proteins. In *Advanced Dairy Chemistry* McSweeney, P. L. H.; O'Mahony, J. A., Eds. Springer: 2016; pp 155-178.

4. Mezzenga, R.; Fischer, P. The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. *Reports on Progress in Physics* **2013**, 76, (4), 046601.
5. Mahmoudi, N.; Mehalebi, S.; Nicolai, T.; Durand, D.; Riaublanc, A. Light-Scattering Study of the Structure of Aggregates and Gels Formed by Heat-Denatured Whey Protein Isolate and b-Lactoglobulin at Neutral pH. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 3104-3111.
6. Mehalebi, S.; Nicolai, T.; Durand, D. Light scattering study of heat-denatured globular protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules* **2008**, 43, 129-35.
7. Inthavong, W.; Kharlamova, A.; Chassenieux, C.; Nicolai, T. Structure and flow of dense suspensions of protein fractal aggregates in comparison with microgels. *Soft Matter* **2016**.
8. Nicolai, T. Formation and functionality of self-assembled whey protein microgels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, 137, 32-8.
9. Phillies, G. D. Self and tracer diffusion of polymers in solution. *arXiv preprint cond-mat/0403109* **2004**.
10. Amsden, B. Modeling solute solutions in aqueous polymer solutions *Polymer* **2002**, 43, 1623-1630.
11. Masaro, L.; Zhu, X. X. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Prog. Polym. Sci.* **1999**, 24, 731–775.
12. de Kort, D. W.; van Duynhoven, J. P. M.; Van As, H.; Mariette, F. Nanoparticle diffusometry for quantitative assessment of submicron structure in food biopolymer networks. *Trends in Food Science & Technology* **2015**, 42, (1), 13-26.
13. Balakrishnan, G.; Nicolai, T.; Durand, D. Relation between the gel structure and the mobility of tracers in globular protein gels. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, 388, 293-299.
14. Croguennoc, P.; Nicolai, T.; Kuil, M. E.; Hollander, J. G. Self-diffusion of Native Proteins and Dextran in Heat-set Globular Protein Gels. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 5782.
15. Colsenet, R.; SÅ¶rdeman, O.; Mariette, F. o. Effects of ionic strength and denaturation time on polyethyleneglycol self-diffusion in whey protein solutions and gels visualized by nuclear magnetic resonance. *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, 54, (14), 5105-5112.

16. Colsenet, R.; Soderman, O.; Mariette, F. Pulsed Field Gradient NMR Study of Poly(ethylene glycol) Diffusion in Whey Protein Solutions and Gels. *Macromolecules* **2006**, *39*, 1053-1059.
17. Nguyen, B. T.; Nicolai, T.; Chassenieux, C.; Schmitt, C.; Bovetto, L. Heat-induced gelation of mixtures of whey protein isolate and sodium caseinate between pH 5.8 and pH 6.6. *Food Hydrocolloids* **2016**, *61*, 433-441.
18. Higgins, J. S.; Benoit, K. C., *Polymer and Neutron Scattering*. Clarendon Press: Oxford, 1994.
19. Berne, B.; Pecora, R., *Dynamic light scattering With Applications to Chemistry, Biology, and physics*. Dover Publications: New York, 2000.
20. Jonasson, J. K.; Loren, N.; Olofsson, P.; Nyden, M.; Rudemo, M. A pixel-based likelihood framework for analysis of fluorescence recovery after photobleaching data. *Journal of Microscopy* **2008**, *232*, 260-269.
21. Soumpasis, D. M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical journal* **1983**, *41*, (1), 95-97.

Titre : Elaboration et caractérisation de nanoparticules de protéines

Mots clés : Isolat de protéine de lactosérum, Isolat de protéine de soja, Polydispersité, Suspensions dense, Compressibilité osmotique, Redistribution de fluorescence après photoblanchiment.

Résumé : Des solutions d'isolat de protéine de lactosérum (WPI) et d'isolat de protéine de soja (SPI) ont été chauffées à différentes concentrations en protéines conduisant à la formation d'agrégats fractals polydispersés de taille moyenne variable. La structure des solutions a été analysée par diffusion de la lumière en fonction de la concentration en protéine. La compressibilité osmotique et la longueur de corrélation dynamique diminuent quand la concentration augmente deviennent indépendantes de la taille initiale des agrégats pour les suspensions denses. Pour une taille d'agrégat donnée, la viscosité augmente initialement exponentiellement avec la concentration croissante puis diverge. Plus les agrégats sont grands, plus l'augmentation de la viscosité apparaît à des concentrations faibles. La dépendance avec la concentration de la viscosité des solutions d'agrégats fractals est beaucoup plus forte que celle de microgels. Le comportement de mélanges de différents types d'agrégats (fractals/fractals ; fractals/microgels et WPI/SPI) a été étudié principalement par rhéologie.

Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) a été utilisé pour étudier la diffusion de chaînes de dextran marquées par des fluorophores dans des solutions d'agrégats et des gels de WPI. Une diffusion brownienne est observée dans des suspensions d'agrégats et des gels faibles formés juste au-delà de C_g avec un coefficient de diffusion (D) qui diminue avec l'augmentation de la concentration mais, avec une dépendance plus faible que celle de la viscosité (η). A des concentrations plus élevées, des gels densément réticulés sont formés, ce qui induit une forte diminution de la mobilité des chaînes de dextran. Pour ces systèmes, la recouvrance de la fluorescence est logarithmique avec le temps, suggérant une distribution exponentielle des coefficients de diffusion. La diffusion des chaînes de dextran a également été étudiée en fonction de la concentration en protéines pour les suspensions de trois types d'agrégats de WPI (petits et grands fractals et microgels).

Title : Development and characterization of protein nanoparticles.

Keywords : Whey protein isolate, Soy protein isolate, Polydispersity, Dense Suspensions, Osmotic compressibility, Fluorescence recovery after photobleaching.

Abstract : Polydisperse fractal aggregates of varying average sizes were formed when solutions of whey protein isolate and soy protein isolate were heated at different protein concentrations and at neutral pH. The structure of these fractal aggregate solutions was analyzed by light scattering as a function of protein concentration. In dense suspension, the osmotic compressibility and the correlation length decreases with increasing concentration and become independent of the initial aggregate size. In this concentration regime, the aggregates are strongly interpenetrated and can be visualized as a set of "blobs". For a fixed aggregate size, the viscosity initially increases exponentially with increasing concentration and then diverges at the gel point. Larger fractal aggregates show a more important increase of the viscosity with increasing concentration than smaller aggregates, because they are less dense. The increase of the viscosity was much stronger for large fractal aggregates than for homogeneous microgels (microgels were formed by heating the WPI solution in presence of CaCl_2) of the same size.

Dynamic light scattering, rheology and FRAP measurements were performed to investigate mixtures of different type of aggregates of WPI (fractals/fractals, fractals/microgels) and fractals of mixtures of WPI and SPI. Flow measurements were used to characterise the rheological properties of the aggregate suspension whereas Fluorescence recovery after Photobleaching (FRAP) was used to determine the self diffusion of fluorophore-labelled dextrans chains in mixtures over a wide range of concentrations. The results were compared to the concentration dependence of zero shear viscosity, gel stiffness, osmotic compressibility and correlation length. Brownian diffusion of the dextran chains was observed in aggregate suspensions and weak gels formed just above the gel point with a diffusion coefficient that decreased with increasing concentration, but the dependence was weaker than that of the viscosity. At higher concentrations, densely crosslinked gels were formed, which induced a sharp decrease in the mobility of the dextran chains. For these systems, the recovery of fluorescence was logarithmic over time, suggesting an exponential distribution of diffusion coefficients.