



# **Utilisation des hautes pressions hydrostatiques pour la modulation des interactions protéiques et la séparation des protéines sériques**

**Thèse**

**Alice Marciniak**

**Doctorat en sciences des aliments**  
*Philosophiae Doctor (Ph.D.)*

Québec, Canada

© Alice Marciniak, 2018

# **Utilisation des hautes pressions hydrostatiques pour la modulation des interactions protéiques et la séparation des protéines sériques**

**Thèse**

**Alice Marciniak**

Sous la direction de:

Alain Doyen, directeur de recherche  
Yves Pouliot, codirecteur de recherche

## Résumé

La valorisation du lactosérum par le fractionnement de molécules à hautes valeurs ajoutées est d'autant plus d'actualité au Québec, que ce sous-produit est encore considéré comme une matière résiduelle fertilisante. Bien que les concentrés de protéines sériques possèdent des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles intéressantes, la production de protéines sous forme purifiée est davantage désirée pour leur utilisation dans des produits de qualité et très recherchés notamment dans les formulations infantiles. De manière générale, la séparation des protéines est réalisée à l'aide de technologies présentant un impact environnemental et économique non négligeable ainsi qu'une efficacité non optimale voire limitée. Dans le cas des protéines sériques majeures (alpha-lactalbumine –  $\alpha$ -la et bêta-lactoglobuline –  $\beta$ -lg), la principale problématique reliée à leur récupération sélective concerne leur poids moléculaire similaire. L'utilisation de technologies émergentes et écoresponsables devient donc un incontournable, de manière à améliorer les procédés déjà existants. Cette thèse avait donc pour but de montrer que la modulation des interactions protéiques par l'utilisation des hautes pressions hydrostatiques (HPH), une technologie considérée comme éco-efficace et émergente, et l'utilisation d'un ligand, les caséines (CN), permettrait de fractionner ces deux protéines majeures pour la génération de fractions purifiées à des rendements maximaux.

Une première étude a permis de déterminer les paramètres optimaux de pressurisation (temps et niveau de pression) ainsi que le type de ligand utilisé (CN isoélectriques – CI ou micellaires – CM). De manière générale, les HPH ont permis de spécifiquement agréger la  $\beta$ -lg et les CN, tout en maintenant l' $\alpha$ -la sous sa forme monomérique. L'acidification subséquente à pH 4,6 a généré une précipitation de ces agrégats de  $\beta$ -lg/CN. L'augmentation du niveau de pression et de temps a permis d'augmenter l'agrégation entre la  $\beta$ -lg et les CN sans impacter significativement l'agrégation de l' $\alpha$ -la. De plus, l'utilisation de CI en comparaison aux CM n'a pas permis d'améliorer le taux de purification de l' $\alpha$ -la alors que le rendement de cette dernière a diminué.

Une deuxième étude a porté sur l'évaluation du potentiel concentration-dépendant des CN à agir comme un ligand pour le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg. De manière générale, l'augmentation de la concentration en CN n'a pas permis d'améliorer les taux de purification et les rendements en  $\alpha$ -la. Au contraire, pour des concentrations élevées en CN, le taux d'agrégation de la  $\beta$ -lg diminuait, suggérant un effet chaperon des CN sur l'agrégation par les HPH de la  $\beta$ -lg. En outre, la pressurisation des protéines sériques sans CN a permis d'obtenir les meilleurs paramètres de purification en  $\alpha$ -la ainsi qu'en  $\beta$ -lg.

Finalement, une troisième étude a permis de mettre en avant l'effet chaperon de la  $\beta$ -CN sur l'agrégation de la  $\beta$ -lg en présence d' $\alpha$ -la. Alors que la pressurisation des protéines sériques seules ou combinées entraînait la formation d'agrégats globulaires de faibles poids moléculaires et générait des solutions turbides, l'ajout de  $\beta$ -CN a permis de réduire la turbidité des solutions, et ce, proportionnellement à sa concentration. En parallèle, cette limpidité corrélait avec la présence d'agrégats de types amorphes et de hauts poids moléculaires. Finalement, comme requis pour une protéine chaperonne, il a été démontré que la  $\beta$ -CN n'était pas impliquée dans ces agrégats.

Les travaux de cette thèse ont rencontré l'ensemble des objectifs définis et contribuent significativement à l'avancement des connaissances concernant l'extension de l'application des HPH pour le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg présentant ainsi des taux de purification et des rendements d'intérêt majeur pour l'industrie de transformation des produits laitiers.

## Abstract

Whey valorization through the better fractionation of highly valuable molecules is more than ever relevant in Quebec, as it is still used as a fertilizing residual material. Although whey protein concentrates have multiple nutritional and functional properties, the production of highly pure single proteins is more desired for their use in high quality product and in particular for infant formula. Usually, proteins separation is done using technologies with significant environmental and economic impacts as well as non-optimized effectiveness. For the major whey proteins such as alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg), the main problematic is their similar molecular weight. Consequently, the use of emerging and green technologies is crucial to improve the efficiency and productivity of existing processes. This thesis aims to demonstrate the potential of using a green and emerging technology known as high hydrostatic pressure (HHP) coupled with a ligand, caseins (CN) for the modulation of protein-protein interactions to improve the fractionation of the two major whey proteins:  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg with higher purity.

In the first study, optimal pressurization parameters (duration and level of pressure) as well as ligand type (isoelectric CN – IC or micellar – MC) were determined. Broadly, HHP treatment induced specific aggregation of  $\beta$ -lg and CN, while maintaining  $\alpha$ -la in its monomeric form. Subsequent acidification to pH 4.6 caused the precipitation of the  $\beta$ -lg/CN aggregates. Increase of pressure and process duration increased the  $\beta$ -lg/CN aggregation without significantly impacting  $\alpha$ -la aggregation. Furthermore, the use of IC in comparison with MC improved the purification rate of  $\alpha$ -la while decreasing its recovery rate.

As part of a second study, the evaluation of concentration of CN as a ligand for the fractionation of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg was studied. The increase in CN concentration did not improve both the purification and recovery rates of  $\alpha$ -la. Rather, at higher CN concentration,  $\beta$ -lg aggregation rate decreased, suggesting a chaperone-like effect of CN on the  $\beta$ -lg pressure-induced aggregation. In addition, pressurization of whey proteins in the absence of CN, resulted in a higher purification rate and recovery degree for both  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg in soluble and insoluble fractions, respectively.

Lastly, in the third study, the chaperone-like effect of  $\beta$ -CN on the pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la was investigated. Pressurization of single or combined whey proteins generated small globular aggregates with turbid solutions, whereas, the addition of  $\beta$ -CN decreased the turbidity in a concentration dependent manner. In parallel, limpidity was correlated with the presence of larger but amorphous aggregates with higher molecular weight. Furthermore, it was demonstrated that  $\beta$ -CN was not part of the aggregates formed, which is an important criterion of a chaperone-like protein.

The present work has met all the objectives set in this thesis and contributed significantly to the advancement of knowledge concerning the application of HHP for the fractionation of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg with high purification and recovery rates, which is of great interest for the dairy processing industry.

<b>Table des matières</b> .....	
<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xi</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xv</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>xviii</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Revue de littérature</b> .....	<b>3</b>
2.1 LES PROTEINES LAITIERES .....	3
2.1.1 <i>Protéines de la phase colloïdale : les caséines</i> .....	3
2.1.1.1 Généralités .....	3
2.1.1.2 Propriétés et structure de la micelle .....	6
2.1.1.2.1 Modèle submicellaire chevelu .....	6
2.1.1.2.2 Modèle à dualité des liens .....	7
2.1.1.2.3 Modèle à nanoclusters .....	8
2.1.2 <i>La phase soluble : les protéines sériques</i> .....	10
2.1.2.1 Les protéines majeures .....	10
2.1.2.1.1 Bêta-lactoglobuline .....	10
2.1.2.1.2 Alpha-lactalbumine .....	13
2.1.2.2 Les protéines mineures .....	15
2.1.2.3 Intérêt de valorisation des protéines sériques .....	15
2.2 FRACTIONNEMENT DE L' A-LA ET B-LG .....	17
2.2.1 <i>Procédés conventionnels</i> .....	17
2.2.2 <i>Couplage de technologies</i> .....	21
2.3 LES HAUTES PRESSIONS HYDROSTATIQUES .....	22
2.3.1 <i>Principe</i> .....	22
2.3.2 <i>Description du procédé</i> .....	24
2.3.3 <i>Effet des HPH sur les différents composants alimentaires biologiques et organiques</i> .....	25
2.3.4 <i>Aspect économique: avantages et inconvénients</i> .....	27
2.4 EFFET DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX ET DES PROCÉDES SUR LA DENATURATION DES PROTEINES LAITIERES .....	28
2.4.1 <i>Dénaturation par modification du pH réactionnel</i> .....	30
2.4.2 <i>Dénaturation par les agents physiques</i> .....	33
2.4.2.1 Généralités .....	33
2.4.2.2 Dénaturation des protéines sériques par les traitements thermiques .....	34
2.4.2.3 Dénaturation des protéines laitières par les HPH .....	35
2.4.2.3.1 Impact sur les CN .....	36
2.4.2.3.2 Impact sur la $\beta$ -lg .....	38
2.4.2.3.3 Impact sur l' $\alpha$ -la .....	40
2.4.2.3.4 Impact sur un mélange d' $\alpha$ -la et $\beta$ -lg .....	42
2.4.2.3.5 Impact des HPH sur un mélange d' $\alpha$ -la, $\beta$ -lg et CN .....	42
2.4.3 <i>Effet chaperon des caséines</i> .....	44
2.4.3.1 Généralités .....	44
2.4.3.2 Effet sur l'agrégation des protéines sériques .....	46
2.4.3.3 Controverse autour des protéines chaperonnes .....	49
<b>3 Problématique, hypothèse et objectifs de recherche</b> .....	<b>51</b>

3.1	PROBLEMATIQUE .....	51
3.2	BUT ET HYPOTHESE.....	51
3.3	OBJECTIFS DE RECHERCHE .....	52
<b>4</b>	<b>The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of alpha-lactalbumin enriched fraction .....</b>	<b>53</b>
4.1	RESUME .....	54
4.2	ABSTRACT .....	54
4.3	INTRODUCTION .....	55
4.4	MATERIALS AND METHOD.....	58
4.4.1	<i>Materials</i> .....	58
4.4.2	<i>Preparation of micellar casein</i> .....	58
4.4.3	<i>Chemical analysis of protein powders</i> .....	59
4.4.4	<i>Preparation of protein model solutions</i> .....	60
4.4.5	<i>Experimental methodology</i> .....	60
4.4.6	<i>Determination of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin concentrations in supernatants</i> .....	61
4.4.7	<i>Calculation of protein recovery, alpha-lactalbumin purification degree and protein ratio</i> .....	62
4.4.8	<i>Composition of pressure-treated solutions</i> .....	63
4.4.9	<i>Determination of milk protein profiles and composition of aggregates</i> .....	63
4.4.10	<i>Statistical analysis</i> .....	64
4.5	RESULTS .....	64
4.5.1	<i>Relationship between pressure-time and protein denaturation/aggregation</i> .....	64
4.5.2	<i>Impact of pressurization and acidification on whey protein using 3D plots</i> .....	66
4.5.3	<i>Alpha-lactalbumin purification degree and final protein ratio</i> .....	70
4.5.4	<i>Analysis of aggregates in pressurized solutions</i> .....	72
4.6	DISCUSSION .....	73
4.6.1	<i>Effect of HHP on whey proteins</i> .....	74
4.6.2	<i>Interactions between WP and CN under HHP treatment</i> .....	74
4.6.3	<i>Type of interactions induced by pressurization</i> .....	75
4.6.4	<i>Protein recoveries and purification degrees</i> .....	76
4.6.5	<i>Benefits, technological challenges and industrial feasibility of HHP</i> .....	77
4.7	CONCLUSION.....	78
4.8	CONFLICTS OF INTEREST .....	78
4.9	ACKNOWLEDGEMENTS.....	79
4.10	REFERENCES .....	79
<b>5</b>	<b>Evaluation of casein as a binding ligand protein for purification of alpha-lactalbumin from beta-lactoglobulin under high hydrostatic pressure. ....</b>	<b>84</b>
5.1	RESUME .....	85
5.2	ABSTRACT .....	85
5.3	INTRODUCTION .....	86
5.4	MATERIAL AND METHODS.....	87
5.5	RESULTS AND DISCUSSION.....	88
5.5.1	<i>Relationship between CN concentration and protein denaturation/aggregation</i> .....	88
5.5.2	<i>Protein recoveries and purification degrees</i> .....	89
5.6	CONCLUSION.....	93
5.7	CONFLICTS OF INTEREST .....	94
5.8	ACKNOWLEDGEMENTS.....	94



5.9	REFERENCES .....	94
<b>6</b>	<b>Studying a chaperone-like effect of beta-casein on pressure-induced aggregation of beta-lactoglobulin in the presence of alpha-lactalbumin. ....</b>	<b>97</b>
6.1	RESUME .....	98
6.2	ABSTRACT .....	99
6.3	INTRODUCTION .....	99
6.4	MATERIALS AND METHODS .....	101
6.4.1	<i>Materials</i> .....	101
6.4.2	<i>Preparation of protein model solutions</i> .....	102
6.4.3	<i>HHP treatment</i> .....	102
6.4.4	<i>Turbidity measurement</i> .....	103
6.4.5	<i>Composition of pressure-treated milk protein solutions</i> .....	103
6.4.6	<i>Determination of protein profiles and composition of milk protein aggregates</i> .....	103
6.4.7	<i>Transmission electron microscopy</i> .....	104
6.5	RESULTS AND DISCUSSION .....	104
6.5.1	<i>Effect of HHP on turbidity depending on protein composition</i> .....	104
6.5.2	<i>Relationship between protein composition and aggregation induced by hydrostatic pressurization</i> .....	107
6.5.3	<i>Morphology of pressure-induced aggregates</i> .....	110
6.5.4	<i>Composition of pressure-induced aggregates</i> .....	111
6.6	CONCLUSION .....	114
6.7	CONFLICTS OF INTEREST .....	115
6.8	ACKNOWLEDGMENTS .....	115
6.9	REFERENCES .....	115
<b>7</b>	<b>Conclusion Générale .....</b>	<b>119</b>
7.1	PRINCIPAUX RESULTATS .....	119
7.2	CONTRIBUTION ORIGINALE DE LA THESE .....	121
7.3	PERSPECTIVES .....	122
7.3.1	<i>Application pour la production de protéines purifiées à haute valeur</i> .....	123
7.3.2	<i>Application pour les boissons enrichie en protéines</i> .....	123
7.3.3	<i>Application pour la production fromagère</i> .....	123
<b>8</b>	<b>Références .....</b>	<b>124</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Principales caractéristiques physico-chimiques des caséines (CN) bovines. Tiré de Croguennec et al., (2008).....	4
Tableau 2. Composition principale de la micelle de caséine (CN). Tiré de Brulé et al., (1997)....	6
Tableau 3. Propriétés physico-chimiques des protéines mineures du lactosérum. Tiré de Boland et al., (2014).....	15
Tableau 4. Composition et propriétés d'un lactosérum bovin doux. Tiré de Smithers (2015). ....	16
Tableau 5. Technologies, paramètres étudiés, rendements et taux de pureté obtenus lors du fractionnement de l'alpha-lactalbumine. ....	18
Tableau 6. Effet des HPH sur les différentes interactions chimiques en fonction de leur $\Delta V_{\text{dissociation}}$ . Tiré de Rivalain et al., (2010).....	26
Tableau 7. Effets des HPH sur les composés laitiers. Tiré de Chawla, Patil and Singh (2011)...	27
Tableau 8. Agents dénaturants (P : physique et C : chimique) et leurs effets sur les liens ou interactions chimiques. (Dias et al., 2010; Dumetz, Chockla, Kaler & Lenhoff 2008; Konigsberg 1972; Møller & Le Maire 1993; Rivalain et al., 2010; Salvi, De Los Rios & Vendruscolo 2005; Tang, Pikal & Taylor 2002; Zhang, Witham & Alexov 2011; Zou, Habermann-Rottinghaus & Murphy 1998). ....	30
Tableau 9. Facteurs influençant les modifications de tailles des micelles de CN par les HPH. Tiré de Huppertz, Fox, et al., (2006). ....	38
Tableau 10. État de l'art concernant l'effet chaperons des caséines (CN) sur l'agrégation des protéines sériques selon les paramètres utilisés. Tiré et adapté de Akbari et al., (2018) et Yong and Foegeding (2010). ....	47
Table 11. Composition (% dry weight basis) of micellar casein (MC), isoelectric casein (IC), alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg) powders .....	60
Table 12. Protein ratios in the pH 4.6 soluble fraction, calculated according to equation (3). The mean protein ratio values are based on multiple replicates ( $n>3$ ). Each comparison has been made by treatment (Tukey test; $\alpha = 0.05$ ). Mean values with different letters are significantly different.....	72
Table 13. $\beta$ -lg purification degree in pellets as a function of casein concentration.....	93
Table 14. Composition of different protein model solutions and their relative ratios containing alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la), beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg) and beta-casein ( $\beta$ -CN). Samples 1-3, 4-6 and 7-11 contain respectively one, two and three proteins in the solution.....	102

## Liste des figures

- Figure 1. Représentation de la structure sous-micellaire chevelue selon (A) Waugh (1958),(B) Schmidt (1982) et Walstra (1990, 1999), (C) Jenness and Walstra (1984). ..... 7
- Figure 2. Structure micellaire selon le modèle à dualité des liens, décrit par Horne (1998, 2002); Qi (2007). Les régions hydrophobes des CN (en gris) interagissent pour former une structure micellaire stabilisée par du phosphate de calcium (triangles). ..... 8
- Figure 3. Modèle à nanoclusters décrit par De Kruif and Holt (2003), et tiré de Dalglish and Corredig (2012). Les  $\alpha_s$ -CN et  $\beta$ -CN (en orange) interagissent avec le phosphate de calcium formant des nanoclusters (sphères grises). Certaines  $\beta$ -CN (en bleu) peuvent former des interactions protéines-protéines de types hydrophobes. Tandis que la para- $\kappa$ -CN (en vert) et le CMP (en noir) se positionne à la surface de la micelle..... 9
- Figure 4 : Répartition des principales protéines du lait bovin. Adapté de De Boer (2014) ..... 10
- Figure 5. Représentation de la séquence en acide-aminés (code à une lettre) du variant B de la  $\beta$ -lg bovine et substitution dans le variant A (en vert). En rouge sont représentées les ponts disulfures, en bleu, les feuillets  $\beta$ , et en rose les hélice  $\alpha$ . Tiré et adapté de Paul et al., (2013).. 11
- Figure 6. Mécanisme d'échange SH/S-S intra- et intermoléculaires au sein de la  $\beta$ -lg..... 12
- Figure 7: Représentation de la séquence en acide-aminés (code à une lettre) du variant B de l' $\alpha$ -la bovine. En rouge sont représentés les ponts disulfures; en orange, le site de fixation de l'ion calcium; en bleu, les feuillets  $\beta$ ; et en rose les hélice  $\alpha$ . La flèche correspond au repliement du tryptophane 104. Tiré et adapté de Farrell et al., (2002)..... 14
- Figure 8. Diagramme elliptique de la stabilité des caractéristiques d'une protéine et de l'inactivation des microorganismes (flèches noires) sous traitement de pressurisation et thermique. L'état natif de la protéine est stable à l'intérieur de l'ellipse. Tiré et adapté Heremans and Smeller (1998).  $\Delta H$  correspond aux changements d'enthalpie ( $< 0$  = réaction exothermique,  $> 0$  = réaction endothermique) et  $\Delta V$  aux changements de volume. .... 24
- Figure 9. Système de HPH à pressurisation directe et indirecte. Tiré et adapté de Yordanov and Angelova (2010). ..... 25
- Figure 10. Impact de l'environnement et des procédés sur les protéines laitières. Tiré de Gaucheron (2011). ..... 29
- Figure 11. Variation de la charge nette (z) en fonction du pH d'une protéine dont le point isoélectrique (pHi) est de 6. (Trait pointillé orange). Tiré et adapté de Coffey, Fenton, O'mahony and Henry (2012). ..... 31
- Figure 12. Paysage énergétique de dépliement et d'agrégation d'une protéine (anglais - folding and misfolding protein energy landscape). Selon le niveau d'énergie apporté par un traitement, la protéine va interagir avec elle-même par des liaisons intra-moléculaires. Lorsque la protéine atteint un état « déplié », elle va être sujette à des réactions inter-moléculaires résultant en une agrégation sous formes amorphe, oligomérique et fibrillaire. Finalement le changement de conformation de la protéine entraîne une modification de son niveau d'hydratation, Tiré et adapté de Muntau, Leandro, Staudigl, Mayer and Gersting (2014) et Kim, Hipp, Bracher, Hayer-Hartl and Ulrich Hartl (2013). ..... 34

Figure 13. Modification de la taille et de la structure des micelles de caséines (CN) suite à un traitement de hautes pressions hydrostatiques de A) 100 à 250 MPa et B) 280 à 400 MPa à 20 °C. Tiré avec permission de Gebhardt et al., (2006).....	37
Figure 14. Mécanisme d'action d'une protéine chaperonne sur l'agrégation/dénaturation de la protéine cible.....	45
Figure 15. Différence d'intensité d'absorbance par spectroscopie (généralement mesuré avec $\lambda=360, 395$ et $600$ nm) selon le type d'agrégats. Tiré et adapté de Zhao et al., (2016) et Hall et al., (2016).....	50
Figure 16. Schematic diagram representing the steps for the fractionation of $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) from milk proteins solution using HHP as a pre-treatment. ....	61
Figure 17. Native (A) and reduced (B) PAGE of pressure-treated milk protein solutions using micellar casein (MC) as ligand. Native (C) and reduced (D) PAGE of pH 4.6-soluble fractions (supernatants) recovered after acidification at pH 4.6 of pressure-treated milk protein solutions when MC was used as ligand.....	66
Figure 18. Surface response of the recovery of $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) and $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) in pH 4.6 soluble fraction in function of the time and the pressure for MC (A) and IC (B). The colour scale at right represents the mean values of multiple replicates ( $n>3$ ) of protein recovery (%).....	68
Figure 19. Effect of the level of pressure and time on the recovery of $\alpha$ -la and $\beta$ -lg remaining in the supernatant using MC (A) and IC (B), after an acidification at pH 4.6. Bars show the standard deviation of mean values of multiple replicates ( $n>3$ ). Each comparison has been made by protein ( $\alpha$ -la and $\beta$ -lg) (Tukey test; $\alpha = 0.05$ ). Mean values with different letters are significantly different.....	70
Figure 20. Effects of the level of pressure and time and the type of casein on the $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) purification rate. Mean values of purification rates are based on multiple replicates ( $n>3$ ). Each comparison has been made by type of casein (IC and MC) (Tukey test; $\alpha = 0.05$ ). Mean values with different letters are significantly different. ....	71
Figure 21. (A) HPSEC protein profile of pressure-treated milk protein solutions ( $\alpha$ -la, $\beta$ -lg and IC) at 300 s 600 MPa using isoelectric casein (IC) as ligand and (B) protein profile under the reduced conditions of fractions recovered from HPSEC analysis (B).....	73
Figure 22. PAGE profile under native condition of pressure-treated (600 MPa, 300s) milk protein solutions (A) and pH 4.6-soluble fractions (supernatants) (B) at varying concentration of casein (CN) used as ligand. Concentrations of $\beta$ -lg and $\alpha$ -la remained constant at $2.5$ mg.mL <sup>-1</sup> each. .	89
Figure 23. Effect of the concentration of casein on the recovery of alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la – black circle) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg – white circle) remaining in the supernatant after an acidification at pH 4.6 (A) and on the alpha-lactalbumin purification degree (B). Concentration of each WP was maintain at $2.5$ mg.mL <sup>-1</sup> . Bars show the standard deviation of mean values of multiple replicates ( $n=3$ ). Each comparison has been made by proteins ( $\alpha$ -la and $\beta$ -lg) (Tukey test; $\alpha = 0.05$ ). *Mean values with significant difference. ....	92
Figure 24. Visual appearances of model protein solutions (alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and beta-casein) at different ratios, before (control, upper panel) and after HHP (pressurized, lower panel). ....	105

Figure 25. Optical density (360 nm) of different model protein solutions composed of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and beta-casein before (control) and after HHP treatment (pressure-treated). ..... 107

Figure 26. Optical density (360 nm) of model protein solutions at a 1:1 ratio of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin and varying amounts of beta-casein before (control) and after HHP treatment (pressure-treated). ..... 107

Figure 27. SDS-PAGE under native conditions of control (C) and pressure-treated (P) model protein solutions composed of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and beta-casein at different ratios. Large aggregates were identified as X<sub>1</sub> and X<sub>2</sub>, where X<sub>1</sub> corresponds to protein stuck in the loading well while X<sub>2</sub> corresponds to large aggregates mainly formed during HHP treatment of beta-lactoglobulin, ..... 109

Figure 28. Transmission electron microscopy images of pressure treated samples at various ratios of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin and beta-casein at magnification factors of 20 and 50K. .... 111

Figure 29. HPSEC profile of control and pressure treated (A and B) solutions and composition of aggregates generated by HHP of solutions (C) containing beta-lactoglobulin and beta-casein (0:1:1) determined by SDS-PAGE under reducing conditions..... 112

Figure 30. HPSEC profile of control and pressure treated (A and B) solutions and composition of aggregates generated by HHP of the solutions (C) containing alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and beta-casein (1:1:1), determined by SDS-PAGE under reducing conditions. 113

*« L'émerveillement, plutôt que le doute,  
est la source de la connaissance »*

*- Franklin P. Adams -*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Alain Doyen pour m'avoir accordé sa confiance pour réaliser ce beau projet. Merci Alain pour ton soutien inconditionnel, ton écoute, mais surtout de m'avoir transmis ta passion. Tu as cru en moi et m'a offert de nombreuses opportunités qui ont été très enrichissantes et m'apporteront grandement dans mon avenir. Tu m'as laissée mener ce projet-là où je le voulais, tu m'as écoutée et soutenue dans chacune de mes décisions. Merci mille fois pour ta présence et tes conseils, tant professionnels que personnels et d'avoir fait de moi une personne aussi confiante et passionnée. Je suis fière d'avoir été ta première étudiante au doctorat et d'avoir vécu cette expérience avec toi.

J'aimerais également remercier mon codirecteur le Dr. Yves Pouliot pour ses précieux conseils, ses commentaires et son soutien. Yves, tu m'as appris à toujours me poser et reposer des questions et à garder les pieds sur terre. Je me souviendrai toujours de l'anecdote que tu nous as racontée sur la mouche sourde qui ne sait plus voler. Merci aussi pour ton soutien et tes bons mots qui m'ont donné confiance, tout particulièrement lors du congrès de l'ADSA en juin 2016.

Je souhaite aussi remercier le Dr. Michel Britten, pour avoir relu chacun de mes articles et avoir apporté à mes manuscrits de bonnes réflexions et de nombreux commentaires toujours judicieux, qui ont, je suis sûre, amélioré grandement la qualité de mes articles. Merci Michel pour tes retours toujours très rapides et ta disponibilité.

Je remercie aussi tout particulièrement le Dr. Guillaume Brisson d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire de thèse, mais aussi pour sa disponibilité à répondre à mes nombreuses interrogations.

Finalement, je remercie le Dr. Michel Pouliot, directeur recherche et développement chez Agropur, coopérative laitière, d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Un grand merci également à Diane Gagnon, Mélanie Martineau, Jacinthe Thibodeau, Véronique Perreault et Sophie Fortin pour leur aide technique précieuse en laboratoire. Merci à Richard Janvier, pour les heures d'excitation passées devant le microscope. Finalement, merci à Anne-Françoise Allain, Hélène Fortier et Christine Dumas pour avoir toujours répondu avec le sourire à mes demandes. Merci aussi au personnel du Centre de Développement Bioalimentaire du Québec (CDBQ) de m'avoir permis de réaliser les cycles de pressurisation.

À tous les étudiants et professionnels de l'équipe de Alain et Yves ainsi qu'à Fred, pour tous ces moments et rires partagés dans notre laboratoire. À mes collègues et amis qui ont partagé mon quotidien pendant ces trois années et qui m'ont écoutée raconter à quel point j'aimais mon travail. Merci pour votre soutien, vos conseils, votre écoute et votre aide. À Sophie, Lysis et Shyam, pour votre bonne humeur quotidienne et pour avoir apporté à mes journées beaucoup de fous rires et de beaux moments. Un merci tout particulier à Loïc d'avoir commencé cette aventure avec moi et d'avoir été ma famille ici à Québec. Merci pour tous ces bons moments en ta compagnie, tes lectures au pied de mon lit et nos débats. Je te souhaite le meilleur.

À Stéphane, Angela, Syrine, Joahnn et Angèle pour avoir été ma première attache ici à Québec et d'avoir joué un rôle important dans mon accomplissement personnel. À mes amis en France (particulièrement Caroline, Flavie, Justine, Delphine et Denis), merci pour votre compréhension et votre soutien à distance. Merci d'être disponible pour moi à chacun de mes retours en France. Merci pour votre amitié inconditionnelle.

Finalement, un énorme merci à Shyam pour avoir été à mes côtés depuis le premier jour. Merci mille fois Shyam pour m'avoir toujours écoutée, conseillée, aidée, d'avoir partagé tes expériences, d'avoir été mon inspiration et ma fierté. Merci pour notre belle relation, tant amicale que professionnelle qui j'espère nous mènera loin tous les deux. Merci de m'avoir toujours poussée dans mes limites, poussée dans mes retranchements, poussée dans ma réflexion et poussée à être LA meilleure. Mais surtout, MERCI de m'avoir soutenue, d'avoir vécu avec moi chaque joie, chaque peine, chaque incertitude et chaque rebondissement de cette aventure.



Merci d'avoir été ma famille, merci de m'avoir accueillie dans ta vie, merci à ta femme et ton fils de m'avoir fait une place dans votre cœur, merci d'avoir rendu cette expérience si incroyable.  
MERCI.

À ma famille, Camille et Steve, Stanislas, Louis, Maman et Philippe, Papa et Anne, Papichou et Mamichou, Danielle, Jean et Martha, merci du fond du cœur pour m'avoir toujours poussée à la réussite, pour avoir partagé chaque instant de bonheur, de tristesse et de fierté avec moi. Merci d'avoir toujours été présents pour moi, d'avoir veillé sur moi, d'avoir accepté mes choix, mais surtout d'avoir cru en moi à chaque instant. J'espère toujours vous rendre fiers.

## Avant-propos

Cette thèse est divisée en sept chapitres. Le premier chapitre correspond à l'introduction générale de l'étude, tandis que le deuxième constitue un état de l'art sur lequel l'hypothèse et les objectifs de la recherche se sont appuyés. Le chapitre 3 présente ainsi le but du projet, l'hypothèse qui y est rattachée et les objectifs de recherche qui en découlent. Les chapitres 4, 5 et 6, correspondant aux travaux de recherche effectués dans le cadre de cette thèse, sont présentés sous forme d'articles scientifiques.

Au chapitre 4, Les paramètres de pressurisation (temps et niveau de pression) et le type de caséines (isoélectrique – CI ou micellaire – CM) ont été étudiés pour le développement d'une technologie verte pour le fractionnement de l'alpha-lactalbumine ( $\alpha$ -la) et de la bêta-lactoglobuline ( $\beta$ -lg) à partir de solution modèle. L'article « **The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of an alpha-lactalbumin enriched-fraction** » a été publié sous cette même forme dans le journal *Green Chemistry* (IF = 8,586) en décembre 2017 (doi : 10.1039/C7GC03428H). L'entièreté de la planification et de l'exécution des expériences ainsi que l'analyse des résultats a été effectuée par l'auteur de cette thèse, de même que la rédaction de ce chapitre. Les Drs. Alain Doyen et Yves Pouliot, respectivement directeur et codirecteur, ont supervisé les travaux et révisé le manuscrit. La contribution des Drs. Shyam Suwal et Michel Britten lors de l'analyse des résultats et de la révision est aussi reconnue par l'attribution du statut de coauteur de l'article. Les travaux de ce chapitre ont fait l'objet d'une présentation au colloque STELA 2017 (22-23 mai). Ils ont également permis d'obtenir le 3e prix dans la catégorie "Dairy Foods – Graduate Student Paper Presentation Competition" lors du 112<sup>e</sup> congrès annuel de l'American Dairy Science Association (juin 2017).

Au chapitre 5, l'étude portait sur l'évaluation des caséines (CN) comme potentiel ligand pour l'agrégation spécifique avec la  $\beta$ -lg dans un but d'améliorer le fractionnement de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg par utilisation des hautes pressions hydrostatiques (HPH). Les résultats ont permis de mettre en avant un potentiel effet chaperon des CN sous traitement de pressurisation statique. L'article « **Evaluation of casein as a binding ligand protein for purification of alpha-lactalbumin**

**from beta-lactoglobulin under high hydrostatic pressure** » a été publié sous la forme d'une *short communication* dans le journal *Food Chemistry* (IF = 4,946) en septembre 2018 (doi : 10.1016/j.foodchem.2018.09.110). La planification, les expériences ainsi que l'analyse des résultats et la rédaction du manuscrit ont été effectuées par l'auteur de la thèse. Les travaux ont été encadrés par les Drs. Alain Doyen et Yves Pouliot. Les Drs. Michel Britten, Guillaume Brisson et Shyam Suwal ont participé à l'analyse des résultats et à la révision du manuscrit et leur collaboration a été reconnue comme coauteurs de l'article. Ces résultats ont également été présentés lors du colloque STELA 2017 et du 112e congrès annuel de l'American Dairy Science Association (juin 2017).

Au chapitre 6, l'étude sur l'effet chaperon de la  $\beta$ -CN sur l'agrégation par les HPH de la  $\beta$ -lg en présence d' $\alpha$ -la a permis de mettre en avant la non-linéarité de l'agrégation des protéines et de la turbidité d'une solution tout en montrant l'effet chaperon de la  $\beta$ -CN sous traitement de pressurisation. L'article « **Studying a chaperone-like effect of beta-casein on pressure-induced aggregation of beta-lactoglobulin in the presence of alpha-lactalbumin** » a été publié dans le journal *Food Hydrocolloids* (IF = 5,089) en mai 2018 (doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.05.038). Comme pour le chapitre précédent, les travaux ont été encadrés par les Drs. Alain Doyen et Yves Pouliot. Les Drs. Michel Britten, Guillaume Brisson et Shyam Suwal ont collaboré lors de l'interprétation des résultats et la révision du manuscrit et leur contribution a été reconnue comme coauteurs de l'article. Finalement, le Dr Shyam Suwal a également participé à la planification. L'ensemble de la démarche associée à ce projet et aux résultats a été présenté par l'auteure de cette thèse à l'Université Laval dans le cadre de deux séminaires scientifiques (14 novembre 2016 et 12 mars 2018).

Le chapitre 7 conclut cette thèse en soulignant les principaux résultats et retombées scientifiques de ces travaux ainsi que les perspectives de recherche.

Un article supplémentaire sur le fractionnement de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg à partir de lactosérum de fromagerie intitulé « **Effect of the pH on the fractionation of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin from whey using high hydrostatic pressure** » est en attente de soumission et n'a

pas été intégré volontairement à la thèse. En effet, une potentielle collaboration de recherche avec un partenaire industriel est actuellement en discussion, justifiant l'exclusion de cet article du manuscrit par souci de confidentialité.

En parallèle à ce projet de doctorat, une revue de littérature intitulée « **Enhancing Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins And Production of Bioactive Peptides Using High Hydrostatic Pressure Technology** » portant sur l'utilisation des HPH pour améliorer la production de peptides bioactifs par hydrolyse enzymatique a été publiée en tant que premier auteur, dans le journal *Trends in Food Science and Technology* (IF = 6,609) en août 2018 (doi : 10.1016/j.tifs.2018.08.013).

Finalement, quatre autres articles ont été rédigés en tant que co-auteurs démontrant ainsi l'importance des expertises développées dans le cadre de ce doctorat :

- « **Effect of high hydrostatic pressure and polysaccharidases on the extraction of antioxidant compounds from red seaweeds** » soumis dans *Food Engineering*, et rédigé par S. Suwal, V. Perreault, A. Marciniak, L. Beaulieu et A. Doyen.
- « **Physicochemical modifications of micellar casein after interaction with peptide f1-8 generated after tryptic hydrolysis of beta-lactoglobulin** » soumis dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, et rédigé par S. Suwal, R. Oliveira, M. Pimont-Farge, A. Marciniak, A. Doyen et Y. Pouliot.
- « **Effect of skim milk treated with high hydrostatic pressure on permeate flux and fouling during ultrafiltration** » publié en septembre 2017 dans *Journal of Dairy Science* (IF = 2,749 – doi : 10.3168/jds.2017-12774) et rédigé par M. Leu, A. Marciniak, J. Chamberland, Y. Pouliot, L. Bazinet et A. Doyen,
- « **High hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis improved enzymatic hydrolysis and generation of peptides with antioxidant activity of flaxseed protein isolate** » publié en octobre 2018 dans *Food Research International* (IF = 3.52 – doi : 10.1016/j.foodres.2018.10.034) et rédigé par M. Franck, V. Perreault, S. Suwal, A. Marciniak, L. Bazinet et A. Doyen.

## 1 Introduction

Les deux protéines majeures du lactosérum, l'alpha-lactalbumine ( $\alpha$ -la – 14,2 kDa) et la bêta-lactoglobuline ( $\beta$ -lg – 18,3 kDa), sont largement utilisées en industries alimentaires pour leurs propriétés nutritionnelles (composition en acides aminés (AA) essentiels) et fonctionnelles (moussantes, gélifiantes, etc.). Ces protéines sont également une source intéressante de peptides bioactifs (antimicrobiens, opioïdes, anti hypertensives, anti-tumorales, antivirales, hypocholestérolémiantes) générés suite à leur hydrolyse par diverses protéases (Jouan 2002). Comme tout ingrédient commercial, leur valeur économique et la diversité de leurs applications en industrie bioalimentaire est d'autant plus importante lorsque ces deux protéines sont disponibles sous forme purifiée.

Cependant, la séparation des protéines pour l'obtention de fractions purifiées reste un enjeu majeur en industries alimentaires, nutraceutiques et pharmaceutiques. La problématique principale étant que les technologies à faible impact environnemental et disponibles à l'échelle industrielle présentent une efficacité limitée, en particulier lorsque la séparation concerne un mélange protéique de poids moléculaires similaires tel que l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg dans le lactosérum.

Néanmoins, plusieurs stratégies et technologies de séparation ont déjà été utilisées pour le fractionnement de protéines ayant des poids moléculaires similaires. Ainsi, concernant l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg, l'utilisation de technologies conventionnelles telles que le couplage de procédés baromembranaires (membrane d'ultrafiltration de 30 et 100 kDa) (Cheang & Zydney 2004), l'utilisation de leur différence de stabilité face à des traitements thermiques ou chimiques (précipitation sélective) (Muller, Chaufer, Merin & Daufin 2003) ou de la chromatographie ionique (Goodall, Grandison, Jauregi & Price 2008) présentent des défis technologiques (sélectivité, rendement et pureté à optimiser) et environnementaux (production d'extraits, gestion des effluents, utilisation d'eau, etc.) majeurs. Malgré cela, l'obtention d'une séparation optimale, par l'utilisation de technologies matures, applicables à grande échelle et écoresponsables reste difficile à atteindre (Kamau, Cheison, Chen, Liu & Lu 2010). Par conséquent, il est nécessaire d'étudier et d'élargir les applications de technologies émergentes et innovantes afin d'optimiser la séparation de ces deux protéines.

La technologie utilisant les hautes pressions hydrostatiques (HPH) consiste à appliquer une pression uniforme à une matrice, à l'aide d'un liquide transmetteur de pression, généralement l'eau. L'utilisation de ce procédé en industrie alimentaire s'est essentiellement développée dans les années 1990 au Japon en tant que procédé de conservation des aliments. Les HPH ont également été appliquées sur le lait et divers produits laitiers (fromage, yogourt) dans une optique d'optimisation des processus de gélification ou d'affinage par exemple (Lerasle *et al.*, 2012).

De ce fait, les HPH ont largement été étudiées pour leur impact sur les protéines lactières (Bravo, Felipe, Lopez-Fandino & Molina 2015; Mazri, Sanchez, Ramos, Calvo & Perez 2012; Patel, Singh, Anema & Creamer 2006). Globalement, les traitements de pressurisation engendrent une modification de la taille des micelles de CN et une dénaturation des protéines sériques dont l'importance est grandement dépendante des propriétés physico-chimiques des protéines et l'intensité des paramètres de traitement appliqués (pression, temps, température). A titre d'exemple, il a été démontré que la  $\beta$ -lg est plus sensible aux HPH que l' $\alpha$ -la, favorisant ainsi des interactions spécifiques entre la  $\beta$ -lg et les CN (Boland, Singh & Thompson 2014; Patel *et al.*, 2006).

Cependant, parmi les CN, certaines sont connues pour avoir des propriétés chaperonnes et donc inhiber l'agrégation d'autres protéines, suite à un stress (Yong & Foegeding 2010). Cette activité est encore très peu connue lorsque l'agrégation a lieu sous hautes pressions et pourrait jouer un rôle important dans l'agrégation spécifique de la  $\beta$ -lg avec les CN.

Par conséquent, la différence de sensibilité de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg aux HPH, leurs propriétés physico-chimiques distinctes ainsi que leur agrégation préférentielle avec diverses protéines nous amènent à penser que l'utilisation des HPH et des CN comme protéines ligands, permettrait la séparation de ces deux protéines ( $\alpha$ -la et  $\beta$ -lg) de poids moléculaires similaires. Dans cette

optique, ce projet de doctorat se focalise sur l'utilisation des HPH et des protéines ligands (les CN) pour la séparation de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg par simple acidification subséquente. Trois objectifs spécifiques ont été ainsi développés : 1) étudier les paramètres de pressurisation (temps et pression) et du type de CN (CI ou CM) sur l'agrégation préférentielle de la  $\beta$ -lg aux CN, comparativement à l' $\alpha$ -la suite à un traitement de HPH, et 2) évaluer le potentiel concentration-dépendant des CN en tant que ligand dans le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg et 3) caractériser l'activité chaperonne de la  $\beta$ -CN sur l'agrégation de la  $\beta$ -lg sous HPH en présence d' $\alpha$ -la.

## **2 Revue de littérature**

### **2.1 Les protéines laitières**

Les protéines laitières constituent un apport protéique alimentaire majeur, et possèdent un intérêt nutritionnel important de par leur excellente digestibilité et leur composition équilibrée en AA essentiels. Leurs différentes propriétés fonctionnelles sont attribuées à leur composition en AA et à leur structure très dépendante des caractéristiques physico-chimiques de la matrice alimentaire et des traitements technologiques appliqués (Croguennec, Jeantet & Brulé 2008). Les protéines laitières sont généralement classées en deux groupes selon leur solubilité à pH = 4,6 : les protéines sériques ( $\beta$ -lg,  $\alpha$ -la, sérum albumine bovine – SAB, immunoglobulines – Ig, et lactoferrine – Lf) qui représentent la phase soluble, et les CN, définies comme étant la phase colloïdale du lait. Le projet de recherche portant sur les protéines majeures : CN,  $\beta$ -lg et  $\alpha$ -la, ces dernières seront davantage détaillées dans ce manuscrit.

#### **2.1.1 Protéines de la phase colloïdale : les caséines**

##### **2.1.1.1 Généralités**

Les CN, au nombre de 4 ( $\alpha_{s1}$ -CN ;  $\alpha_{s2}$ -CN ;  $\beta$ -CN et  $\kappa$ -CN), représentent près de 80% des protéines du lait bovin, et forment la phase colloïdale du lait (Brignon, Ribadeau-Dumas, Mercier, Pelissier & Das 1977; Jollès, Schoentgen, Alais, Fiat & Jollès 1972; Mercier, Brignon & Ribadeau-Dumas 1973; Mercier, Grosclaude & Ribadeau-Dumas 1971; Ribadeau-Dumas, Brignon, Grosclaude & Mercier 1972). Il en existe une cinquième, la  $\gamma$ -CN (3% des CN totales)

qui provient de l'hydrolyse de la  $\beta$ -CN par les protéases (plasmine) du lait (Boland *et al.*, 2014; Farrell *et al.*, 2004). Les CN sont des phosphoprotéines riches en leucine et proline (acides aminés hydrophobes). C'est la présence de proline en grande quantité qui est responsable de la structure désordonnée des CN. En outre, les CN se distinguent principalement les uns des autres par le nombre de résidus phosphorylés (régions hydrophiles), la présence ou non de résidus de cystéine (impliqués dans les ponts disulfures responsables de la stabilité de la structure) et de dérivés glucidiques conférant à chacune des CN des propriétés physico-chimiques différentes (Tableau 1).

Tableau 1. Principales caractéristiques physico-chimiques des caséines (CN) bovines. Tiré de Croguennec *et al.*, (2008).

	$\alpha_{s1}$ -CN	$\alpha_{s2}$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN
Résidus AA	199	207	209	169
Poids moléculaire (Da)	23600	25250	24000	19000
Résidus de phosphosérine	8-9	10-13	5	1-2
Résidus de cystéine	0	2	0	2
Point isoélectrique	4,96	5,27	5,2	5,54
Sensibilité au $Ca^{2+}$	++	+++	+	-
Résidus hydrophobes	89	70	112	76

La présence des nombreux groupes phosphorylés au sein des  $\alpha_s$ -CN leur confère une très grande affinité pour les alcalinoterreux ( $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ ). La sensibilité pour ces ions est d'autant plus importante que la quantité de résidus phosphorylés est élevée. En effet ils constituent un site de liaison avec le calcium, nécessaire pour la stabilité des micelles (Rollema & Fox 1992). De plus, les résidus phosphorylés engendrent la formation de zones hydrophiles (Brulé, Lenoir & Remeuf 1997) qui rendent les  $\alpha_s$ -CN très sensibles à la précipitation en présence de très faibles quantités de calcium (Nono Djamen 2011).

Les  $\beta$ -CN et  $\kappa$ -CN présentent un caractère amphiphile très prononcé du fait de la séparation nette entre leurs zones hydrophobes et hydrophiles tandis que les  $\alpha_s$ -CN, possèdent une distribution alternée de leurs zones hydrophobes et hydrophiles et donc de leurs résidus de phosphosérine



(Jouan 2002). Ce caractère amphiphile induit une faible sensibilité de la  $\beta$ -CN au calcium mais celle-ci l'est particulièrement à la température (Nono Djamen 2011). La  $\kappa$ -CN est la seule à posséder un fragment très hydrophile glucidique appelé caséinomacropéptide (CMP) à l'extrémité C-terminale (Brulé *et al.*, 1997; Fox & Mulvihill 1982).

Les CN ont la capacité de s'auto-associer afin de former tout d'abord des sous-micelles puis des structures de plus grandes tailles, des micelles. Ce réarrangement est principalement dû à la répartition des charges et des zones hydrophobes au sein des différentes CN. Les  $\alpha_s$ -CN ont une capacité d'auto-association dépendante du pH ainsi que de la force ionique. Les interactions sont principalement de type électrostatique. Alors que la  $\beta$ -CN, très hydrophobe, se maintient au cœur de la structure par des interactions principalement hydrophobes et donc très sensibles aux changements de températures. Les sous-micelles peuvent contenir jusqu'à 60 monomères de  $\beta$ -CN. Finalement, quant aux  $\kappa$ -CN, elles possèdent une capacité d'association similaire à celle de la  $\beta$ -CN, mais l'intensité des interactions dépend fortement du taux de glycosylation de la protéine (caractère hydrophile de l'extrémité C-terminale). Les  $\kappa$ -CN peuvent s'oligomériser (jusque 15 monomères) par formation de ponts disulfures. L'association des sous-micelles de CN formera les micelles du lait stabilisées par les ponts phosphocalciques (Croguennec *et al.*, 2008).

### 2.1.1.2 Propriétés et structure de la micelle

La micelle de CN consiste en une structure supramoléculaire sphérique d'un diamètre moyen de 150 nm et dont le poids moléculaire varie entre  $10^6$  et  $10^9$  Da. Elle résulte majoritairement de l'association des quatre types de CN ( $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN et  $\kappa$ -CN). Une micelle de CN est composée, sur base sèche, de 92 % de protéines et 8 % de minéraux (majoritairement du phosphate et du calcium) (Tableau 2). Ce sont ces minéraux qui sont responsables de la stabilité de la micelle par la formation de ponts phosphocalciques. Différents modèles théoriques structuraux, présentés dans les sous-sections suivantes, ont été décrits dans la littérature (De Kruif, Huppertz, Urban & Petukhov 2012; Holt, Carver, Ecroyd & Thorn 2013).

Tableau 2. Composition principale de la micelle de caséine (CN). Tiré de Brulé et al., (1997).

Éléments	Proportions (g/100 g)
CN totales :	92
• $\alpha_{s1}$ -CN	33
• $\alpha_{s2}$ -CN	11
• $\beta$ -CN	33
• $\kappa$ -CN	11
Composants minéraux totaux :	8,0
• Phosphate	4,3
• Calcium	2,9

#### 2.1.1.2.1 Modèle submicellaire chevelu

Ce modèle d'abord décrit par Waugh (1958) (Fig. 1 A), puis par Schmidt (1982), Walstra (1990, 1999) (Fig. 1 B), et enfin par Jenness and Walstra (1984) (Fig. 1 C) suggère que la micelle est composée de sous unités micellaires (sous-micelles). Par ailleurs, la composition de chaque sous-unité serait différente. En effet, les sous-micelles situées au cœur de la micelle seraient essentiellement composées d' $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN et formeraient un cœur hydrophobe constitué des fragments apolaires des CN. Tandis que les sous-micelles riches en  $\kappa$ -CN, qui possèdent un caractère amphiphile, se retrouveraient en surface. La surface de la micelle serait constituée de segments polaires des CN (résidus phosphorylés des CN  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ , et des CMP des  $\kappa$ -CN) qui assureraient la stabilité des micelles de CN face au calcium et limiteraient la

croissance de la micelle. La teneur en  $\alpha_s$ -CN serait constante dans chaque sous unité tandis que les teneurs en  $\beta$  et  $\kappa$ -CN varieraient selon la place de la sous unité au sein de la micelle. Les zones hydrophobes des  $\beta$  et  $\kappa$ -CN seraient incrustées dans le réseau formé par les  $\alpha_s$ -CN. Ce modèle a été proposé suite à l'observation de plus petites entités formées par les CN : les sous-micelles, dès lors que le phosphate de calcium était absent (Farrell, Malin, Brown & Qi 2006).

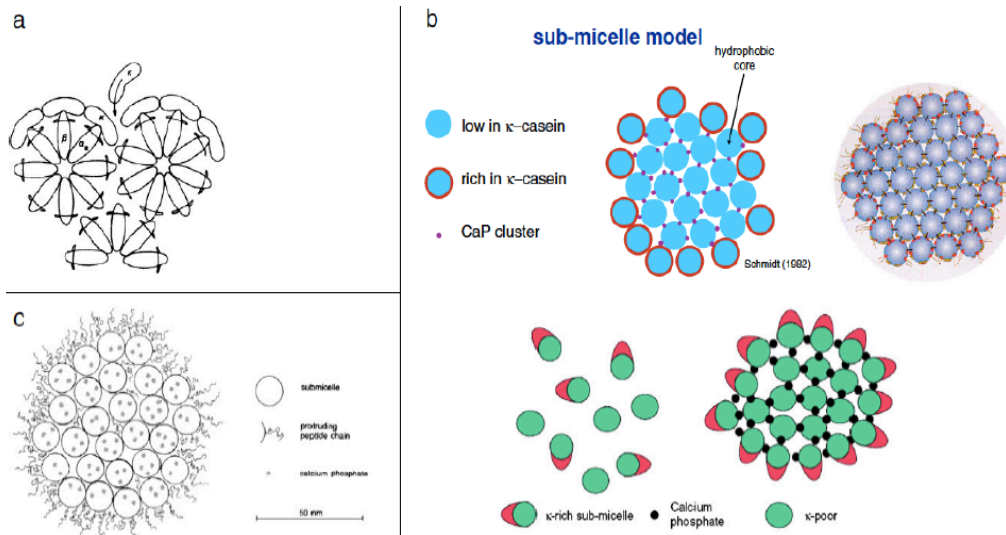


Figure 1. Représentation de la structure sous-micellaire chevelue selon (A) Waugh (1958), (B) Schmidt (1982) et Walstra (1990, 1999), (C) Jenness and Walstra (1984).

### 2.1.1.2.2 Modèle à dualité des liens

Le modèle de structure micellaire à dualité des liens décrit par Horne (1998, 2002) (Fig. 2) a été proposé pour répondre aux critiques concernant la stabilité du phosphate de calcium à haute concentration dans le modèle submicellaire chevelu (Farrell *et al.*, 2006; Horne 2006). Ce modèle prend en compte la réaction des micelles aux différents traitements (changement de pH et température, addition d'urée ou encore retrait du phosphate de calcium par l'EDTA (Horne 1998)). La micelle serait le résultat d'un équilibre entre les excès localisés des forces d'attraction hydrophobes et de répulsions électrostatiques. Les régions hydrophobes des CN (excepté la  $\kappa$ -CN) contiennent des résidus phosphorylés qui permettent l'auto-association des CN. Le pontage

par le phosphate de calcium permettrait de supprimer les répulsions électrostatiques entre deux CN phosphorylés. Dans ce modèle, la structure secondaire des CN n'est pas prise en compte et les interactions hydrophobes ne sont que très grossièrement interprétées (Farrell *et al.*, 2006).

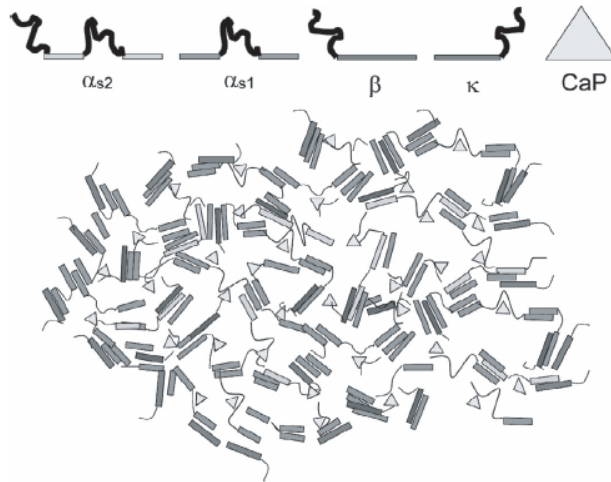


Figure 2. Structure micellaire selon le modèle à dualité des liens, décrit par Horne (1998, 2002); Qi (2007). Les régions hydrophobes des CN (en gris) interagissent pour former une structure micellaire stabilisée par du phosphate de calcium (triangles).

### 2.1.1.2.3 Modèle à nanoclusters

Le modèle à nanoclusters décrit par De Kruif and Holt (2003) est actuellement le plus accepté par la communauté scientifique. Dans ce modèle, les micelles sont considérées comme une matrice homogène dans laquelle le phosphate de calcium est dispersé (Fig. 3). Le phosphate de calcium serait stabilisé à la suite d'interactions avec la fraction phosphopeptidique de la  $\beta$ -CN. Ces nanoclusters seraient à l'origine de la formation de la structure micellaire. En effet, une fois liées à la matrice inorganique (phosphate de calcium), les protéines s'associent par des interactions protéines-protéines pour se polymériser. La structure interne de la micelle est alors comparée à un gel protéique incrusté de nanoclusters de phosphate de calcium. Près de 800 nanoclusters seraient présent dans une micelle de CN (Paul, Mcsweeney & Patrick 2013). Une

fois de plus, dans ce modèle, les  $\kappa$ -CN seraient situées en périphérie de la micelle et permettraient de stabiliser et réguler la taille des micelles. En effet, la  $\kappa$ -CN, ne possédant pas de résidus phosphorylés ne peut prendre part à ces nanoclusters (Dalglish & Corredig 2012; Qi 2007).

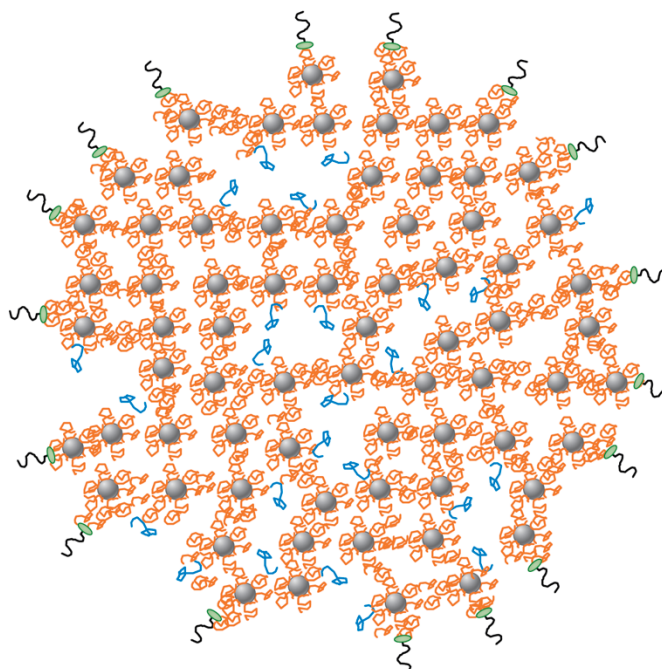


Figure 3. Modèle à nanoclusters décrit par De Kruif and Holt (2003), et tiré de Dalglish and Corredig (2012). Les  $\alpha_s$ -CN et  $\beta$ -CN (en orange) interagissent avec le phosphate de calcium formant des nanoclusters (sphères grises). Certaines  $\beta$ -CN (en bleu) peuvent former des interactions protéines-protéines de types hydrophobes. Tandis que la para- $\kappa$ -CN (en vert) et le CMP (en noir) se positionne à la surface de la micelle.

Bien que les modèles de micelles n'évoluent plus depuis plusieurs années, la distribution des différents composés (molécules d'eau, *nanoclusters*, protéines, etc.) au sein de ce colloïde fait encore l'objet de nombreuses études. En effet, récemment Huppertz *et al.*, (2017) a mis en avant différents niveaux d'hydratation au sein d'une micelle. Ainsi, 30 et 10 % respectivement de l'eau et des protéines totales de la micelles seraient présent à la surface de la micelle, suggérant ainsi

une distribution hétérogène des composés. Finalement Kamigaki, Ito, Nishino and Miyazawa (2018) ont démontré une distribution non-uniforme des *nanoclusters* au sein de la micelle.

### 2.1.2 La phase soluble : les protéines sériques

Les protéines du lactosérum de lait bovin sont composées principalement de la  $\beta$ -lg, de l' $\alpha$ -la, de la sérum albumine bovine (SAB), des immunoglobulines (Ig) et de la lactoferrine (Lf) dont les proportions dans le lait bovin sont données à la Figure 4.

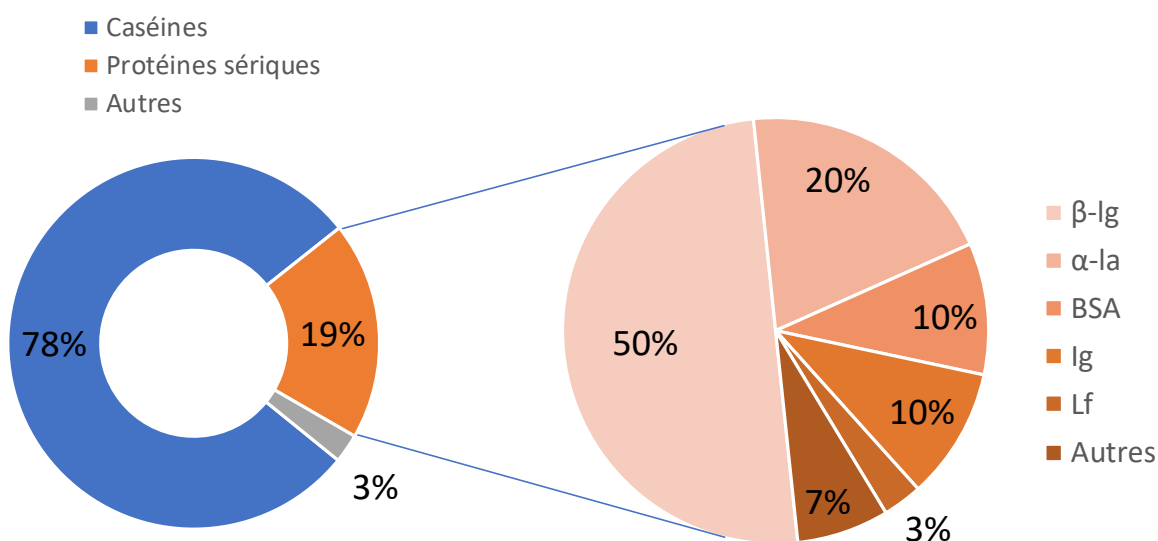


Figure 4 : Répartition des principales protéines du lait bovin. Adapté de De Boer (2014) .

#### 2.1.2.1 Les protéines majeures

##### 2.1.2.1.1 Bêta-lactoglobuline

La  $\beta$ -lg (Fig. 5) est une protéine sérique de 18,36 kDa (162 AA) largement présente dans le lactosérum bovin (50 % des protéines du lactosérum) mais inexistante dans le lait humain, ce qui lui confère un caractère allergène majeur. Il existe 11 variants dont deux dominant chez la vache (A et B). Ces deux variants diffèrent de deux AA situés en position 64 (aspartate substituée par

une glycine, respectivement pour les variants A et B) et 118 (valine substituée par une alanine, respectivement pour les variants A et B) (Paul *et al.*, 2013).

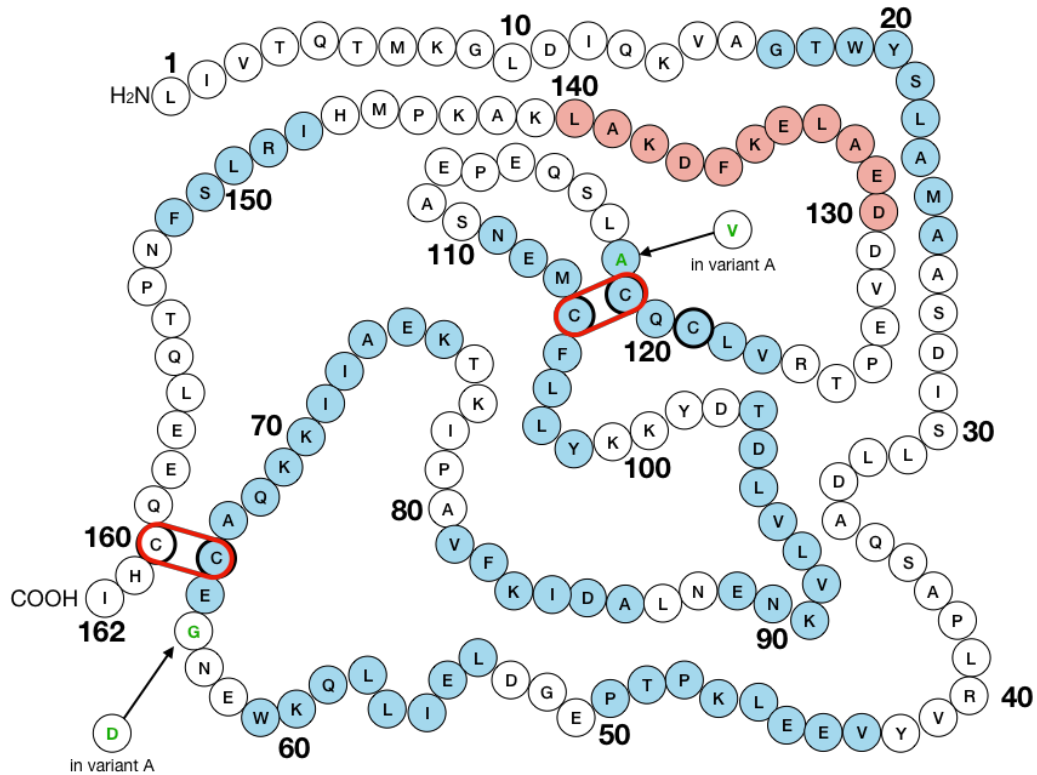


Figure 5. Représentation de la séquence en acide-aminés (code à une lettre) du variant B de la  $\beta$ -lg bovine et substitution dans le variant A (en vert). En rouge sont représentées les ponts disulfures, en bleu, les feuillets  $\beta$ , et en rose les hélice  $\alpha$ . Tiré et adapté de Paul *et al.*, (2013).

La  $\beta$ -lg est composée de 10 % d'hélices  $\alpha$ , et de 50 % de feuillets  $\beta$ . Ces derniers sont responsables de la formation d'une poche hydrophobe au cœur de la protéine (Patel *et al.*, 2006). Cette particularité permet à la  $\beta$ -lg de s'associer avec d'autres molécules hydrophobes ou amphiphiles telles que l'acide palmitique, la vitamine D ou encore la vitamine A (Farrell *et al.*, 2004). Cette région hydrophobe est d'autant plus accessible lorsque la  $\beta$ -lg subit une dénaturation qui engendre un dépliement de sa structure tertiaire.

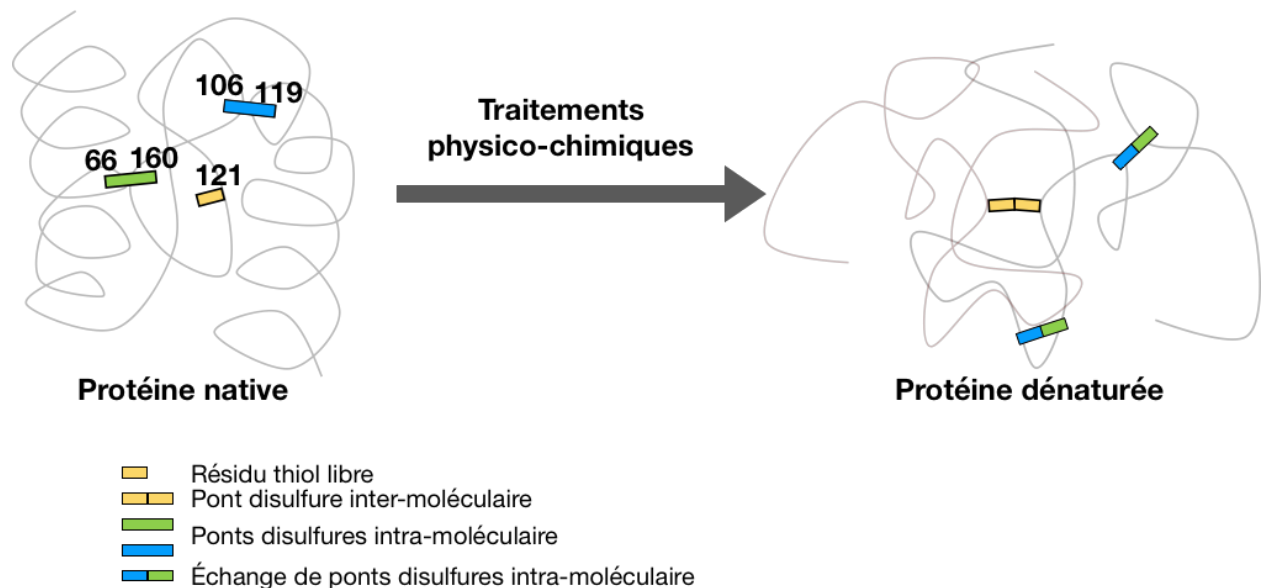


Figure 6. Mécanisme d'échange SH/S-S intra- et intermoléculaires au sein de la  $\beta$ -lg.

Sa structure primaire est composée de 5 cystéines en position 66, 106, 119, 121 et 160 dont 4 permettent la formation de deux ponts disulfures (en position 66-160 et 106-119) stabilisant la structure tertiaire de la protéine (Braunitzer, Chen, Schrank & Stangl 1973). Le résidu cystéine libre (position 121) est situé au cœur de la protéine, ce qui limite sa disponibilité et donc sa réactivité mais peut cependant induire des réactions d'échange SH/S-S intra- et intermoléculaires, suite à son exposition lors d'un apport d'énergie par un traitement physico-chimique (Fig. 6) (Boland *et al.*, 2014). Ainsi, ces procédés, plus largement décrits dans la section « 2.4 Effet des paramètres environnementaux et des procédés sur la dénaturation des protéines laitières », peuvent entraîner l'exposition du groupement thiol libre, responsable de la polymérisation de la  $\beta$ -lg (Paul *et al.*, 2013).



### ***2.1.2.1.2 Alpha-lactalbumine***

L' $\alpha$ -la (Fig. 7) est une protéine de 14,2 kDa (123 AA) dont la teneur est de 50 % dans le lait humain mais seulement de 20 % dans le lait bovin. Deux variants (A et B) ont été décrits pour le lait bovin et ne diffèrent que d'un AA. En effet, le variant A présente une glutamine en position 10 qui est substituée par une arginine pour le variant B (Jouan 2002).

Plus globalement, l' $\alpha$ -la est composée de 50 % d'hélices  $\alpha$  et de 9 % de feuillets  $\beta$ . L' $\alpha$ -la possède un site de fixation spécifique au  $\text{Ca}^{2+}$  composé de quatre résidus d'acide aspartique et une lysine qui permet d'améliorer la stabilité de la structure native de la protéine face à la dénaturation (Kuwanjima 1996). L' $\alpha$ -la existe sous deux formes : la forme holo- (qui est liée à l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ ) et la forme apo- (qui est privée de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ ). Sa structure primaire contient également 8 résidus cystéines (en position 6, 28, 61, 73, 77, 91, 111 et 120) qui assurent la formation de 4 ponts disulfures (entre les cystéines 6-120, 28-111, 61-77 et 73-91) améliorant ainsi la stabilité de la protéine (Brew, Castellino, Vanaman & Hill 1970; Nigen 2008). L'absence de groupement thiol libre rend la protéine beaucoup moins sensible aux phénomènes d'association inter ou intra-protéique.

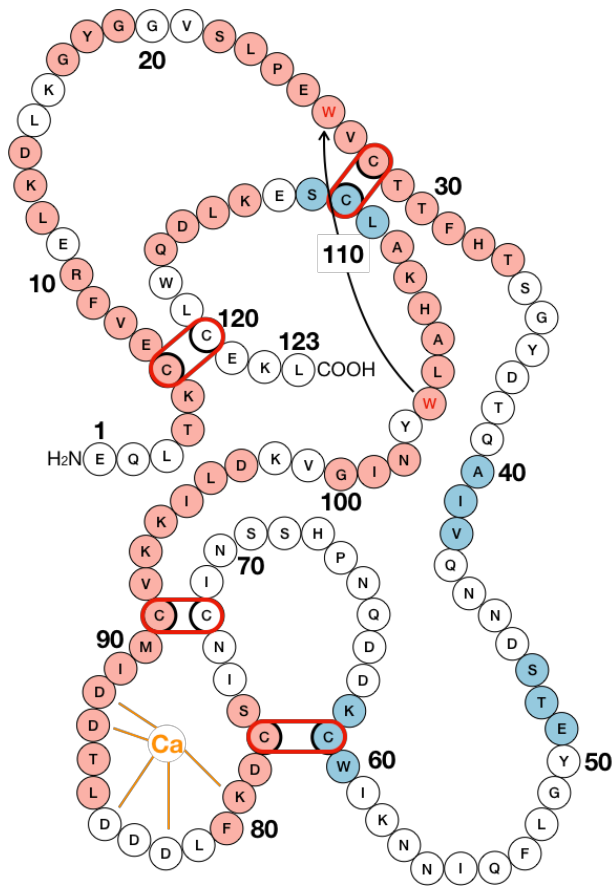


Figure 7: Représentation de la séquence en acide-aminés (code à une lettre) du variant B de l' $\alpha$ -la bovine. En rouge sont représentés les ponts disulfures; en orange, le site de fixation de l'ion calcium; en bleu, les feuillets  $\beta$ ; et en rose les hélice  $\alpha$ . La flèche correspond au repliement du tryptophane 104. Tiré et adapté de Farrell et al., (2002)

L' $\alpha$ -la est capable de se fixer à des ligands tels que des peptides ou des acides gras (Barbana *et al.*, 2006). En effet, des études ont démontré son association avec l'acide oléique ainsi que son affinité préférentielle pour le peptide  $\beta$ -lg f1-8 issu de l'hydrolyse trypsique de la  $\beta$ -lg (Ratté 2013).

### 2.1.2.2 Les protéines mineures

Concernant les protéines mineures, la SAB, les Ig et la Lf constituent respectivement 10, 10 et 3 % des protéines sériques. Leurs propriétés physico-chimiques sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Propriétés physico-chimiques des protéines mineures du lactosérum. Tiré de Boland *et al.*, (2014).

	Sérum albumine bovine (SAB)	Immunoglobuline G (Ig G)	Lactoferrine (Lf)
Résidus AA	583	>500	689
Poids moléculaire (Da)	66399	161000 (IgG1)	76110
Résidus cystéines	18	4	17
Point isoélectrique	5,5	5,1 – 8,3	8,97
Nombre de sous-unités	1	2 chaînes légères, 2 lourdes	1
Abondance (%)	10	10	3

Ces protéines ont des rôles biologiques très divers. La SAB possède un rôle bien connu dans la circulation sanguine chez le bovin, cependant son rôle dans le lait est peu défini. Sa présence dans le lait serait due à la dissociation des cellules épithéliales de la mamelle et elle aurait comme fonction principale le transport de molécules hydrophobes (Boland *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2013). Les Ig, quant à elles, sont des glycoprotéines responsables de la protection immunitaire passive. Finalement, la Lf, protéine de transport du fer dans le plasma, et très importante dans le lait humain, joue un rôle majeur dans la protection non-immunitaire du nouveau-né face aux infections virales et bactériales de par son activité antimicrobienne (Playne, Bennett & Smithers 2003).

### 2.1.2.3 Intérêt de valorisation des protéines sériques

En 2013, ce sont près de 180 millions de tonnes de lactosérum issu de la production de fromages, de yaourts et de CN, qui ont été générées dans le monde. Parmi ces 180 millions, les protéines

(0,7 %), hautement valorisables, représentent 1,5 millions de tonnes (Bylund 2015). Malgré cette haute valeur ajoutée, le lactosérum (Tableau 4) est riche en autres matières organiques (lactose – 4,9 %) et inorganiques (minéraux – 0,5 %), qui lui confèrent une charge polluante importante (demande biochimique en oxygène – DBO et demande chimique en oxygène – DCO respectivement > 30 000 et entre 60 000 et 80 000 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) (Smithers 2015). Pour cela, des restrictions majeures sont entrées en vigueur, au Québec par exemple, pour éviter le déversement du lactosérum dans les eaux. Ainsi, il est considéré actuellement comme une matière résiduelle fertilisante. La valorisation du lactosérum est donc d'intérêt économique et environnemental majeur (Mddelcc 2018; Smithers 2015).

*Tableau 4. Composition et propriétés d'un lactosérum bovin doux. Tiré de Smithers (2015).*

<b>Composé (%) ou mesure</b>	<b>Lactosérum doux</b>
Solides totaux	6,3
Protéines totales :	0,5
CN	<0,05
Protéines sériques	0,7
Gras	0,1
Minéraux	0,5
Lactose	4,9
Eau	93,7
pH	>5,6

Dans un contexte où l'économie circulaire et l'éco-efficience sont les mots-clés en termes de valorisation, la stratégie actuelle est à la diminution de la charge polluante par délactosage du lactosérum, séparant ainsi le lactose des protéines (Smithers 2015). Alors que ces protéines sont ensuite généralement valorisées sous forme d'isolats ou de concentrés, leur fractionnement est préférable pour obtenir des ingrédients constitués de la protéine ciblée sous forme purifiée. Plus particulièrement, la  $\beta$ -lg et l' $\alpha$ -la présentent un intérêt commercial important de par leurs propriétés fonctionnelles (gélification, moussante, etc.) et nutritionnelles en lien avec leur haute teneur en acides aminés essentiels (Smithers 2015). Elles sont aussi des molécules précurseurs de peptides bioactifs (activité anti-hypertensive, antimicrobienne, opioïdes, etc.). En outre, l' $\alpha$ -la bovine purifiée est particulièrement utilisée dans les formulations infantiles en remplacement de

la  $\beta$ -lg, qui est un allergène majeur, due à son absence dans le lait humain. Elle est riche en tryptophane et joue un rôle physiologique important dans la synthèse des neurotransmetteurs à sérotonine (Desilva, Stockmann & Smithers 2003; Kamau *et al.*, 2010; Playne *et al.*, 2003). Leur fractionnement est alors indispensable pour obtenir des protéines purifiées à hautes valeurs.

## **2.2 Fractionnement de l' $\alpha$ -la et $\beta$ -lg**

### **2.2.1 Procédés conventionnels**

De nombreuses stratégies ont été appliquées pour une séparation sélective de ces deux protéines d'intérêt, l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg. Deux techniques, la chromatographie et les procédés membranaires, sont principalement relatées dans la littérature scientifique. En 2011, El-Sayed & Chase recensaient l'ensemble des études portant sur le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg. Depuis, très peu d'études se sont penchées sur cet aspect (El-Sayed & Chase 2011). Le Tableau 5 recense les principales méthodes utilisées pour le fractionnement de l' $\alpha$ -la. Certains articles ne spécifient pas de taux de purification et/ou de récupération de l' $\alpha$ -la bien que l'objectif était le fractionnement des deux protéines sériques majeures.

Tableau 5. Technologies, paramètres étudiés, rendements et taux de pureté obtenus lors du fractionnement de l'alpha-lactalbumine.

	Technologies	Rendement (%)	Pureté (%)	Méthode utilisée	Protéines	Références
Technologies conventionnelles	Précipitation sélective	83-90	23-89	Capacité de fixation du Calcium par l' $\alpha$ -la et solubilité de la $\beta$ -lg à pH acide	$\alpha$ -la	Alomirah and Alli (2004)
	Chromatographie échangeuse de cations	36	ND*	Élution sélective par acétate de sodium à pH 5,8	$\alpha$ -la	Gerberding and Byers (1998)
	Chromatographie d'affinité	47,9	90,6	Ligand peptidique (WHWRKR)	$\alpha$ -la	Gurgel, Carbonell and Swaisgood (2000)
	Chromatographie échangeuse de cations	>92	ND	Élution sélective par acétate, hydroxyde, phosphate et chlorure de sodium	$\alpha$ -la	Doultani, Turhan and Etzel (2004)
	Ultrafiltration (UF)	15	65	Membranes de 300 kDa et 50 kDa	$\alpha$ -la	Muller <i>et al.</i> , (2003)
	UF	>90	10-fold	Membranes de 100 et 30 kDa en série	$\alpha$ -la	Cheang and Zydney (2004)
	UF	56 pH9 33 pH3	ND ND	Membrane tubulaire en céramique de 300 kDa et pH 3,9 et 10	$\alpha$ -la $\beta$ -lg	Almécija, Ibáñez, Guadix and Guadix (2007)
	UF	10	80	Membrane de cellulose régénérée de 100 kDa	$\alpha$ -la	Holland, Kackmar and Corredig (2012)
	UF	87 83	ND ND	Membrane chargée positivement de 300 kDa	$\alpha$ -la $\beta$ -lg	Arunkumar and Etzel (2013)
	Couplage de technologies	Chromatographie d'affinité et précipitation sélective	80	90	Colonne de sépharose avec ligand métallique : Cu(II) – pH 5,5 to 3,8	$\alpha$ -la
Salting-out / chromatographie échangeuse d'anions et gel filtration		ND	ND	Précipitation au sulfate d'ammonium (50 %), colonne DAEC et Sephadex G-50 gel filtration	$\alpha$ -la $\beta$ -lg	Neyestani, Djalali and Pezeshki (2003)
UF et précipitation sélective		46-83	77-99	Membrane de 300 kDa et acidification et traitement thermique (55 °C-120 min)	$\alpha$ -la	Muller <i>et al.</i> , (2003)
UF et hydrolyse tryptique sélective		15	90-95	Membranes de 100 et 150 kDa, hydrolyse tryptique de la $\beta$ -lg jusque	$\alpha$ -la	Konrad and Kleinschmidt (2008)

				DH=10 %, UF (10 kDa)		
	Précipitation sélective, MF et UF	60,7-80,4 80,2-97,3	91,3 97,2	Précipitation thermique de l' $\alpha$ -la, membrane de 0,1 $\mu$ m (MF) et 10 et 25 kDa (UF)	$\alpha$ -la $\beta$ -lg	Toro-Sierra, Tolkach and Kulozik (2013)
	Chromatographie échangeuse de cations et UF	80	97,4	Membrane de 10 kDa, chromatographie échangeuse de cation sur lit expansé	$\alpha$ -la	Geng, Tolkach, Otte and Ipsen (2015)
	Salting-out / chromatographie échangeuse d'anion	ND ND	85 95	Précipitation au sulfate d'ammonium (50 %) et colonne DAEC	$\alpha$ -la $\beta$ -lg	Mao <i>et al.</i> , (2017)
<b>Autre</b>	Dioxyde de carbone supercritique	80	61	60 °C / 8 MPa / 5 %	$\alpha$ -la	Yver, Bonnaillie, Yee, Mcaloon and Tomasula (2012)

\*ND: valeur non déterminée.

La chromatographie est la technologie la plus couramment utilisée pour la séparation de protéines due à sa spécificité et son efficacité même à l'échelle industrielle. Cette technique est très présente dans le domaine pharmaceutique ou biotechnologique, cependant son utilisation dans les domaines alimentaires tels que le secteur laitier est très peu courante, se limitant ainsi à des applications de niche. En effet, la chromatographie représente des frais d'exploitation très élevés et un impact environnemental considérable principalement dû à la régénération de la phase solide ainsi qu'une consommation excessive d'eau (Arunkumar & Etzel 2013; Desilva *et al.*, 2003; Smithers 2015). Dans le cas du fractionnement de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg, l'utilisation de la chromatographie échangeuse d'ions permet d'obtenir de meilleurs rendements, mais des taux de purification plus faibles comparativement aux autres méthodes chromatographiques telles que la chromatographie d'affinité ou hydrophobe. Par exemple, l'utilisation de la chromatographie échangeuse d'ions (cations) a permis d'obtenir des rendements en  $\alpha$ -la atteignant 92 % contre < 48 % dans le cas de la chromatographie d'affinité (Daultani *et al.*, 2004). Plus récemment, Goodall *et al.*, (2008) ont utilisé la chromatographie échangeuse d'anions pour la rétention sélective de la  $\beta$ -lg. Par rinçage et élution, cette équipe de recherche a pu récupérer une fraction enrichie en  $\beta$ -lg présentant un rendement élevé.

Les procédés membranaires sont couramment utilisés en industrie laitière et pourraient donc facilement être appliqués pour la valorisation des coproduits. Cependant leur efficacité est assez limitée lorsqu'il s'agit de molécules à faible différentiel de taille ou de poids moléculaires similaires comme dans le cas de la  $\beta$ -lg et de l' $\alpha$ -la. Plusieurs études ont tenté le fractionnement de ces deux protéines par des procédés membranaires en utilisant une succession de membranes à différents seuils de coupure, modification du matériel, etc. (Tableau 5). Par exemple, Cheang and Zydney (2003) ont démontré que malgré une faible différence de poids moléculaire entre l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg, il était possible de séparer ces deux protéines par l'utilisation de système membranaire en choisissant adéquatement les conditions de filtration (type de membrane, tampon de solubilisation et flux de perméation). Par la suite, ces mêmes auteurs ont fractionné l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg d'un isolat de protéines sériques par le couplage de deux filtrations membranaires successives (30 puis 100 kDa ou 100 puis 30 kDa). Le rendement obtenu variait de 85 à 95 % pour un taux de purification près de 10 fois supérieur à la solution initiale à séparer (Cheang &



Zydney 2004). Cependant ce type de filtration à l'échelle laboratoire n'est plus utilisé car non représentatif des phénomènes observés à l'échelle pilote.

Plus récemment, Arunkumar and Etzel (2013) ont mis en avant que la sélectivité de fractionnement de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg pouvait être augmentée en utilisant des membranes d'ultrafiltration ayant une surface modifiée afin de leur conférer des charges positives. Cette stratégie appliquée sur une membrane de 300 kDa et l'utilisation d'un système de filtration à deux stages permet d'obtenir une solution d' $\alpha$ -la d'un taux de pureté de 87 % à partir d'une solution binaire d' $\alpha$ -la et de  $\beta$ -lg.

Alors que les technologies conventionnellement utilisées à l'échelle industrielle, ne permettent pas d'obtenir à la fois des taux de purification et des rendements protéiques satisfaisant, le couplage de technologies a permis d'améliorer ces caractéristiques dans les fractions finales.

### **2.2.2 Couplage de technologies**

Parmi les stratégies développées, l'utilisation des procédés membranaires couplés à une étape de dénaturation physique, chimique ou enzymatique a été principalement étudiée. Par exemple, Toro-Sierra *et al.*, (2013) ont réalisé la séparation de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg par précipitation thermique sélective de l' $\alpha$ -la. Des agrégats insolubles d'un diamètre de 9,78  $\mu$ m se sont formés. Une séparation subséquente par microfiltration (0,1  $\mu$ m) puis par ultrafiltration (10 à 25 kDa) a permis d'atteindre un taux de pureté de 91,3 et 97,2 % respectivement pour l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg avec un rendement variant entre 60 et 90 % selon les paramètres de filtration utilisés.

Finalement, des études ont aussi porté sur la combinaison de technologies comme l'hydrolyse enzymatique et la filtration membranaire. Dans ce contexte, l'hydrolyse enzymatique spécifiquement dirigée vers l' $\alpha$ -la ou la  $\beta$ -lg permet d'obtenir des fractions enrichies en l'une de ces protéines. L'hydrolyse par la trypsine de la  $\beta$ -lg suivi d'une ultrafiltration à 100 et 150 kDa a

permis d'obtenir une fraction d' $\alpha$ -la pure à 93 %. Cependant, le procédé développé dans cette étude comportait de nombreuses étapes impactant ainsi considérablement le rendement en  $\alpha$ -la (< 15 %) (Konrad & Kleinschmidt 2008).

Bien que ces approches novatrices permettent d'obtenir des rendements et des taux de purification intéressants, ces stratégies ne permettent pas d'améliorer l'aspect environnemental puisque les procédés membranaires utilisés nécessitent des étapes de lavage générant des effluents à traiter (Smithers 2015). De ce fait, l'extension du champ d'application des technologies émergentes, écoresponsables et douces, telles que les HPH, semble une avenue de grand intérêt dans le domaine de la valorisation des coproduits laitiers.

### **2.3 Les hautes pressions hydrostatiques**

Avec plus de 350 systèmes industriels dans le Monde et de nombreuses applications, le procédé des HPH est une technologie verte considérée comme l'un des procédés émergents les plus prometteurs (Jermann, Koutchma, Margas, Leadley & Ros-Polski 2015). Alors que ce procédé permet de conserver essentiellement les propriétés nutritionnelles et organoleptiques d'un produit alimentaire, les HPH ont un impact majeur, mais d'intensité variable selon les paramètres de traitement appliqués, sur les protéines laitières ("Global High Pressure Processing Market: Trends Analysis & Forecasts to 2021" 2016; Pereira & Vicente 2010). Plus spécifiquement, la majorité des études ont portées sur l'effet des HPH sur les deux protéines majeures du lactosérum ( $\beta$ -lg et  $\alpha$ -la) et sur les CN.

#### **2.3.1 Principe**

Le procédé utilisant les HPH, également appelé « pascalisation », a été initialement appliqué en industries alimentaires dans les années 1990. Le principe repose sur l'élévation de la pression (généralement de 100 à 1000 MPa) d'un liquide transmetteur de pression (généralement l'eau). Une pression homogène est alors appliquée en tout point du produit afin de minimiser sa déformation. Le temps de traitement est variable selon les applications et ce procédé peut être

utilisé avec apport ou non de chaleur. Alors que l'eau est un liquide considéré comme très peu compressible, il est estimé qu'une diminution du volume de 4 % à 100 MPa, 11,5 % à 400 MPa, 15 % à 600 MPa et 20 % à 1000 MPa est obtenue (Bridgman 1912; Kahn & Tonello 1999).

Lors de la pressurisation, la compression adiabatique du produit induit une augmentation de sa température de l'ordre de 3 °C / 100 MPa (réaction exothermique –  $\Delta H < 0$ ). Cette augmentation de température dépend du produit pressurisé. À l'inverse, lors de la décompression, le produit retrouve sa température initiale puisque celle-ci est adiabatique (sans échange de chaleur avec le milieu extérieur) (Balasubramaniam, Barbosa-Cánovas & Lelieveld 2016; Koutchma 2014; Lerasle *et al.*, 2012). Ce procédé est principalement gouverné par les trois principes suivants :

- **Isostatique** : toute force soumise à la surface d'un fluide est transmise de manière équitable à la surface de contact. Les effets de la pression sont instantanés et distribués de manière homogène en tout point du produit, quelle que soit sa forme, et sa taille.
- **Le Chatelier** : l'équilibre d'un système se déplacera vers un nouvel équilibre lorsque ce système sera soumis à des perturbations (ici la pression). La pressurisation va entraîner l'équilibre du système vers un nouvel équilibre qui s'accompagne d'une diminution du volume du produit ( $\Delta V < 0$ ) et d'une augmentation de la température ( $\Delta H < 0$ ).
- **Réarrangement microscopique** (*Microscopic Ordering*) : l'augmentation de la pression induit une augmentation du degré de réarrangement des molécules.

Dans le cas des HPH, où le produit est immergé dans un liquide transmetteur de pression, les effets de la pression sont instantanés et homogènes, entraînant ainsi une réduction du volume du produit sans en modifier sa forme. Cette diminution du volume ( $\Delta V < 0$ ) va induire des modifications au niveau des composants alimentaires, principalement les protéines. Ce phénomène est responsable de la dénaturation des protéines (Fig. 8) (Barbosa-Cánovas & Lelieveld 2016).

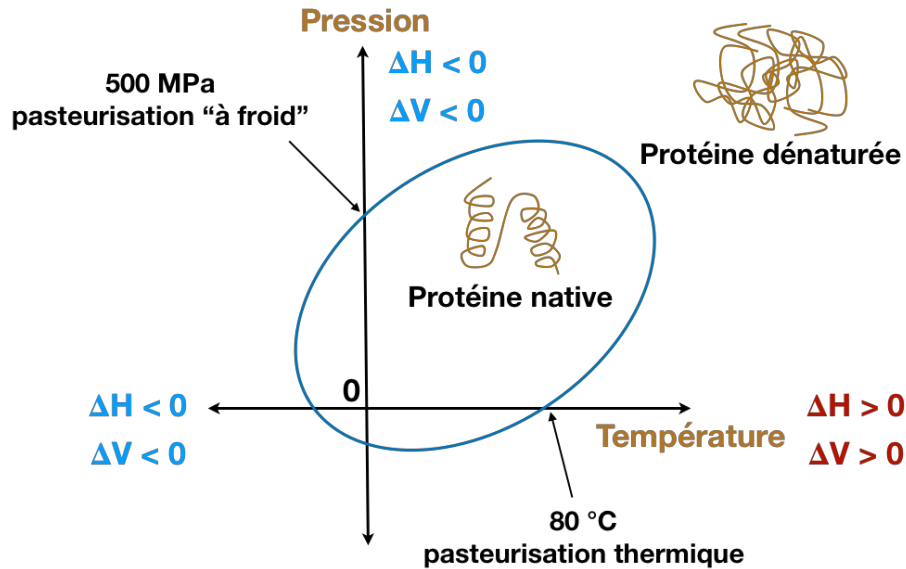


Figure 8. Diagramme elliptique de la stabilité des caractéristiques d'une protéine et de l'inactivation des microorganismes (flèches noires) sous traitement de pressurisation et thermique. L'état natif de la protéine est stable à l'intérieur de l'ellipse. Tiré et adapté Heremans and Smeller (1998).  $\Delta H$  correspond aux changements d'enthalpie ( $< 0$  = réaction exothermique,  $> 0$  = réaction endothermique) et  $\Delta V$  aux changements de volume.

### 2.3.2 Description du procédé

Un cycle de HPH est constitué de plusieurs étapes. Tout d'abord le produit (préemballé) est introduit dans la chambre de pressurisation qui est alors fermée hermétiquement. Cette chambre est ensuite remplie d'un liquide transmetteur de pression (généralement de l'eau). Ce liquide est ensuite comprimé à l'aide d'un piston (méthode directe) ou par injection additionnelle de liquide (méthode indirecte) (Fig. 9). Le produit immergé est alors soumis à la même pression que le liquide. Ce niveau de pression est maintenu pendant un temps déterminé par l'opérateur. Finalement la décompression se déroule de manière instantanée. Généralement les systèmes à l'échelle laboratoire sont des systèmes à pressurisation directe, tandis que les systèmes à l'échelle industrielle sont des systèmes à pressurisation indirecte (Fig. 9).

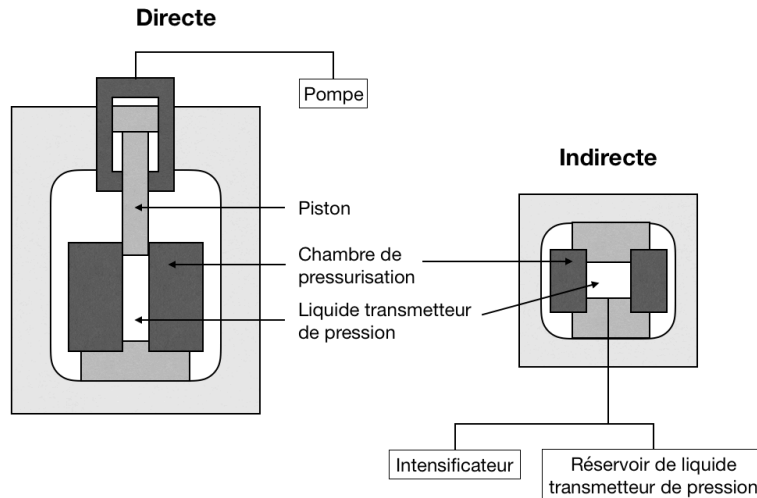


Figure 9. Système de HPH à pressurisation directe et indirecte. Tiré et adapté de Yordanov and Angelova (2010).

### 2.3.3 Effet des HPH sur les différents composants alimentaires biologiques et organiques

D'un point de vue microbiologique, les HPH permettent de réduire de manière considérable la charge bactérienne d'un aliment ainsi que les levures et moisissures. En effet, ce procédé engendre une dénaturation des protéines membranaires (protéines de transport), déstructure la bicouche phospholipidique et le matériel génétique microbien conduisant à une inhibition microbienne (Huang, Hsiang-Mei, Yin-Hsuan, Binghuei Barry & Chung-Yi 2015). Cependant, bien que très efficace sur les formes végétatives, les HPH, aux paramètres utilisés en industrie alimentaire, n'ont que peu d'impact sur les formes sporulées bactériennes. À l'inverse, les spores de levures et moisissures sont facilement inactivées par HPH (Lerasle *et al.*, 2012). Le produit traité doit donc être conservé aux températures de réfrigération, d'où le terme de « pasteurisation à froid ». Cependant, pour inactiver ces spores bactériennes, il est possible d'utiliser des paramètres de pressurisation tels que 827 MPa – 30 min à 75 °C ou bien une pressurisation en deux temps pouvant être comparé à la méthode de tyndallisation décrite lors de traitements thermiques successifs : un cycle entre 50 et 300 MPa pour initier la germination et un cycle > 400 MPa pour inactiver les spores germées (Rivalain, Roquain & Demazeau 2010). Dans le cas des virus, leur inactivation par les HPH est possible lors d'une pressurisation à froid (< 0 °C – dû

à la nature hydrophobe des protéines de la capsid), tandis que les parasites sont inhibés à des pressions < 500 MPa (Rivalain *et al.*, 2010).

Tableau 6. Effet des HPH sur les différentes interactions chimiques en fonction de leur  $\Delta V_{dissociation}$ . Tiré de Rivalain *et al.*, (2010).

Type d'interaction	$\Delta V_{dissociation}$ (ml.mol <sup>-1</sup> )	Effet des HPH
Covalente	+ 10	Stabilisée
Ionique	- 10	Déstabilisée
Hydrogène	+ 3 à - 1	Faible déstabilisation à hautes pressions (> 400 MPa)
Hydrophobe	< 0 (- 10 à - 20)	Déstabilisée

D'un point de vue physico-chimique, les HPH ont un effet non négligeable sur les constituants du lait. En effet, les HPH peuvent stimuler certaines réactions chimiques, ou encore modifier la configuration de certaines molécules (Aouzelleg 2014). Les protéines sont les composants les plus impactés par les HPH, la pressurisation entraînant un bris des liaisons ioniques et hydrophobes ( $\Delta V_{dissociation} < 0$ ), tandis que les liaisons hydrogènes réagissent différemment en fonction du niveau de pression. Les liaisons covalentes sont non perturbées (Tableau 6) (Koutchma 2014; Rivalain *et al.*, 2010). Le maintien des liaisons covalentes suite à un traitement aux HPH a pour conséquence d'assurer la conservation de la structure primaire protéique. À un faible niveau de pression (< 400 MPa), le nombre de ponts hydrogènes est augmenté au sein de la protéine, tandis qu'à un niveau plus élevé (> 400 MPa), ils sont dissociés. La structure secondaire de la protéine est alors particulièrement touchée. Cela va engendrer une dénaturation qui peut être irréversible. Dans le cas d'un mélange protéique, les HPH engendrent l'ouverture et le dépliement des protéines. Cela permet à la protéine d'exposer de nouveaux sites de fixation, ce qui va favoriser les associations inter/intra-protéique (Rivalain *et al.*, 2010). L'effet des HPH sur les protéines laitières est décrit plus en détails dans la section « 2.4. Effet des paramètres environnementaux et des procédés sur la dénaturation des protéines laitières ». Les autres composés laitiers ne sont que très peu impactés par la pressurisation (Tableau 7)

Tableau 7. Effets des HPH sur les composés laitiers. Tiré de Chawla, Patil and Singh (2011).

Composés laitier	Effet des HPH
CN	P > 250 MPa : Diminution de la taille des micelles de CN
Protéines sériques	Perte de structure quaternaire, tertiaire et secondaire selon l'intensité du traitement
Matière grasse	P > 500 MPa : Modification de la taille des globules de gras - diminution à des températures > 25 °C, et augmentation à 4°C
Sucres	Aucune modification observée
Minéraux	Solubilisation du phosphate de calcium colloïdal selon le niveau de pression

### 2.3.4 Aspect économique: avantages et inconvénients

Le procédé utilisant les HPH est une technologie en pleine émergence, dont les avantages sont nombreux en industrie alimentaire. En effet, selon les paramètres, les HPH permettent une réduction significative de la charge microbienne pathogène (pasteurisation à froid), tout en conservant généralement les propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et sensorielles des aliments. De plus, les temps de traitement sont très courts, généralement inférieur à 5 min (Wang, Huang, Hsu & Yang 2016). D'un point de vue économique et environnemental, ce procédé ne nécessite pas d'étape particulière de nettoyage, ce qui en fait une technologie d'intérêt. En effet, dépendamment du procédé, cette étape peut représenter jusqu'à 80 % des frais d'exploitation et générer une quantité non négligeable d'effluents et d'agents chimiques (Smithers 2015).

Néanmoins, il s'agit d'un procédé qui fonctionne en mode « batch » et qui requiert beaucoup de main d'œuvre (5 à 10 % du coût total) et présente, en plus de son coût d'achat (75 à 80 % - entre 300,000 et 3,000,000 \$), un coût de maintenance (5 à 10 %) et d'exploitation considérable (Balasubramaniam *et al.*, 2016; Koutchma 2014). Au niveau énergétique, la principale source de consommation repose sur les paramètres d'opérations comme le niveau de pression, la compressibilité du milieu, l'échelle de l'équipement ou encore le remplissage de la chambre de traitement. Néanmoins, le temps de maintien de la pression aurait un impact très négligeable sur le coût d'opération du procédé (Atuonwu & Tassou 2018).

Alors que l'énergie nécessaire à la compression est perdue lors de la décompression, l'utilisation d'un système de HPH où deux chambres de traitements sont disposées en parallèle peut permettre de récupérer jusqu'à 50 % de l'énergie de la décompression d'une des deux chambres, pour la compression de l'autre chambre (Pereira & Vicente 2010). Finalement, une optimisation du remplissage de la chambre de traitement peut impacter positivement et considérablement sur le coût énergétique par unité de produit fini (Rodriguez-Gonzalez, Buckow, Koutchma & Balasubramaniam 2015). En 2016, Balasubramaniam *et al.*, (2016) ont estimé que l'utilisation d'un système Hiperbaric (Burgos, Espagne) d'une capacité de 135L dans des conditions de pressurisation de 3 min – 600 MPa représentait un coût de 0,117 €.kg<sup>-1</sup>.

Avec son impact environnemental minimisé et son potentiel d'application très varié, le procédé à HPH est une technologie considérée comme prometteuse, principalement pour la production de produit de grande qualité et à haute valeur et ce, dans de nombreuses industries (viande, produits laitiers, boissons, produits marins, etc.) (Jermann *et al.*, 2015; Koutchma 2014).

## **2.4 Effet des paramètres environnementaux et des procédés sur la dénaturation des protéines lactières**

La dénaturation des protéines lactières varie grandement selon leur environnement et les procédés auxquels elles sont sujettes. Ainsi, comme présenté à la Figure 10, l'alcanisation, le refroidissement, le chauffage, les hautes pressions, l'acidification, de même que l'ajout d'agents chélateurs, de sel ou d'ions sont autant de paramètres qui peuvent impacter la solubilité de ces protéines. La solubilité d'une protéine est caractérisée comme étant la résultante de trois facteurs : son hydratation, sa charge électrostatique et sa conformation (Van Oss, Good & Chaudhury 1986). L'atteinte d'un ou plusieurs de ces facteurs entraîne une dénaturation suivie généralement d'une agrégation puis d'une précipitation.



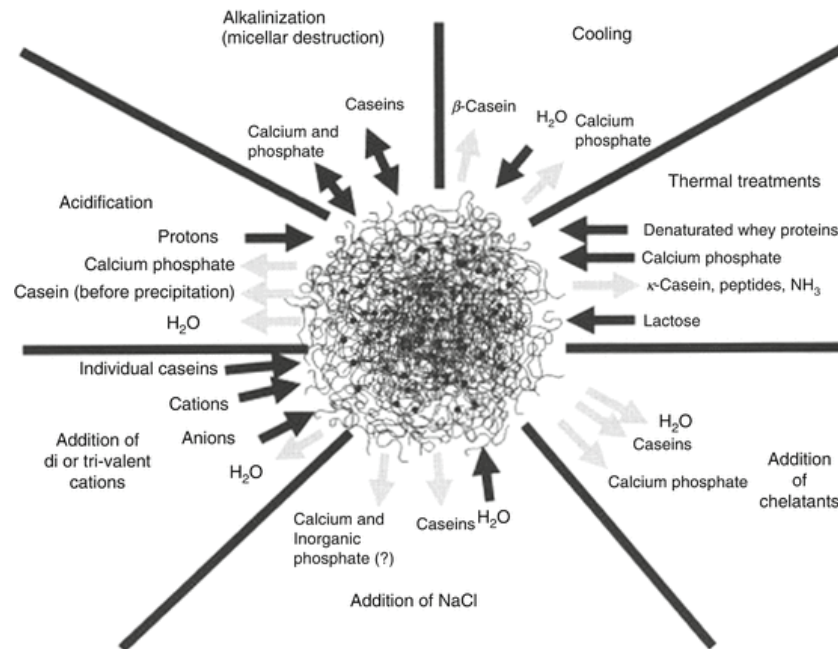


Figure 10. Impact de l'environnement et des procédés sur les protéines lactières. Tiré de Gaucheron (2011).

Les agents dénaturants peuvent être divisés en deux catégories : les agents chimiques et les agents physiques dont les effets sur les liens et les interactions chimiques varient selon l'agent utilisé (Tableau 8). Dans le cas des protéines lactières, l'utilisation d'un agent chimique (modification de pH, ajout de sel, etc.) impacte plus particulièrement la micelle de CN et est responsable d'une modification des charges électrostatiques entraînant un changement de l'équilibre salin entre la phase soluble et la phase colloïdale (micelles de CN), et ainsi une déstabilisation de cette dernière. L'utilisation d'un agent physique (température, HPH, etc.) impacte plus spécifiquement les protéines sériques et est responsable de leur changement de conformation favorisant ainsi les interactions avec les CN pour engendrer une agrégation qui s'en suit d'une précipitation (Kinsella & Morr 1984). Dans le cadre de cette thèse, seuls les effets du pH (agent chimique) et des HPH (agent physique), paramètres au cœur du projet de recherche, seront détaillés dans les sous-sections suivantes.

Tableau 8. Agents dénaturants (P : physique et C : chimique) et leurs effets sur les liens ou interactions chimiques. (Dias et al., 2010; Dumetz, Chockla, Kaler & Lenhoff 2008; Konigsberg 1972; Møller & Le Maire 1993; Rivalain et al., 2010; Salvi, De Los Rios & Vendruscolo 2005; Tang, Pikal & Taylor 2002; Zhang, Witham & Alexov 2011; Zou, Habermann-Rottinghaus & Murphy 1998).

Liens ou interactions	Agents dénaturants	Type d'agent
Électrostatique	Solutions de sel	C
	pH	C
	HPH	P
Hydrogène	Chaleur	P
	HPH (> 400 MPa)	P
	Agents chaotropique	C
	(urée)	C
Hydrophobe	Froid	P
	HPH	P
	Détergents	C
Disulfure	Agents réducteurs	C
	( $\beta$ -mercaptoéthanol)	C

#### 2.4.1 Dénaturation par modification du pH réactionnel

Le pH d'une solution va dicter la charge nette ( $z$ ) de la protéine (Fig. 11). Une charge nette supérieure ou inférieure à 0 favorise les interactions protéines-eau et donc la solubilité du soluté. À l'inverse, une charge nette nulle ( $\text{pH} = \text{pH}_i$  de la protéine) favorise les interactions protéines-protéines. Ce changement de charge peut entraîner une modification de la structure tridimensionnelle de la protéine soit par répulsion entre les chaînes de protéines de charge identique soit par attraction de ces chaînes (charge opposée). De par sa composition et l'enchaînement en acides aminés, chaque protéine possède son propre  $\text{pH}_i$ .

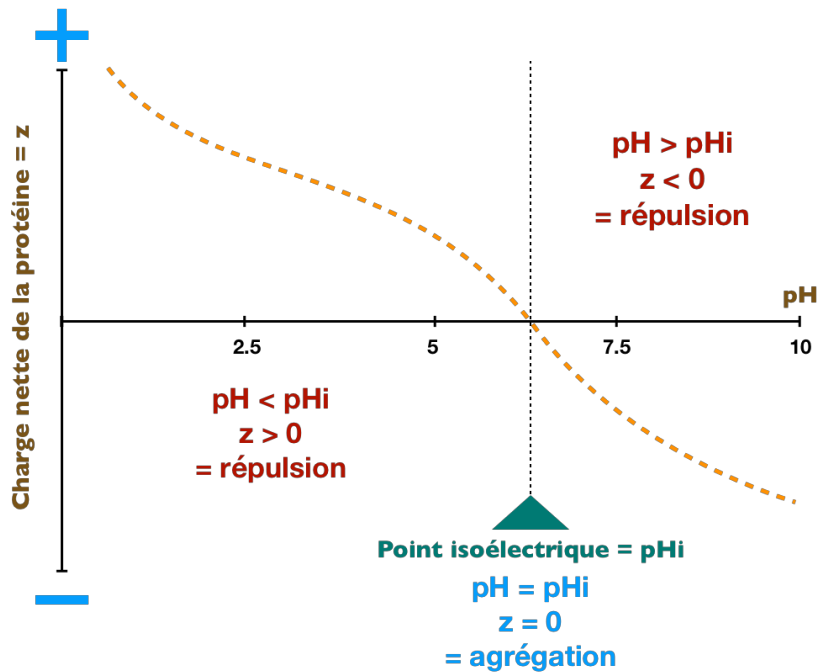
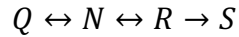


Figure 11. Variation de la charge nette ( $z$ ) en fonction du pH d'une protéine dont le point isoélectrique ( $\text{pHi}$ ) est de 6. (Trait pointillé orange). Tiré et adapté de Coffey, Fenton, O'mahony and Henry (2012).

Dans le cas des protéines lactières, les micelles de CN sont des structures dynamiques qui réagissent considérablement au pH de leur environnement. L'acidification d'un mélange constitué de CN entraîne donc d'importantes modifications de la structure micellaire. En abaissant rapidement le pH de la solution jusqu'au point isoélectrique de la micelle de CN ( $\text{pHi} = 4,6$ ), une floculation sous forme de précipité plus ou moins granuleux est observée. A  $\text{pH} < 5,6$  les ponts phosphocalciques sont affaiblis car les résidus phosphoriques perdent leur capacité à fixer le calcium. L'affinité de la CN est plus forte pour les ions  $\text{H}^+$  que pour le minéral suite à la réduction des charges négatives des groupes carboxyliques (acide glutamique et aspartique) et des résidus phosphorylés (serine). Entre  $\text{pH} 5,6$  et  $4,0$ , la structure micellaire se dégrade progressivement et perd sa forme sphérique par déminéralisation et solubilisation du phosphate de calcium et de certaines CN (essentiellement la  $\beta$ -CN et la  $\kappa$ -CN). Cela va propager la déstructuration des micelles et l'agrégation (Croguennec *et al.*, 2008). Jusqu'à un pH de  $5,2$ , les micelles de CN peuvent se reformer (Boland *et al.*, 2014).

Concernant les protéines majeures du lactosérum, elles existent sous de nombreuses formes qui varient en fonction des valeurs de pH. Dans le cas de la  $\beta$ -lg, trois conformations transitoires sont observées dépendamment du pH et peuvent être représentées comme suit :



Avec Q, structure quaternaire (oligomère); N, conformation native (dimère); R, conformation réversible et S, dénaturation irréversible. Ces changements de conformation en fonction du pH suggèrent des modifications en termes d'hydratation, compressibilité et volume spécifique de la protéine. Le passage réversible de la conformation  $Q \leftrightarrow N$  se fait entre les pH 4 et 6,  $N \leftrightarrow R$  (aussi appelé transition de Tanford) entre pH 6,5 et 7,8. La transition de Tanford correspond à un déplacement de la boucle située entre les feuillets E et D de la position « fermée » à « ouverte », exposant ainsi l'entrée de la poche hydrophobe. Finalement le passage irréversible de la conformation  $R \rightarrow S$  correspond à une dénaturation alcaline (Paul *et al.*, 2013; Taulier & Chalikian 2001).

De manière générale, lorsque la  $\beta$ -lg est sous forme polymérique, elle est en équilibre avec sa forme monomérique. Au pH du lait (6,8), la  $\beta$ -lg existe principalement sous forme de dimères (36 kDa) stabilisés par des liaisons hydrogènes (Jouan 2002). Ces dimères sont toujours formés par deux monomères d'un même variant (Gaucheron 2004). Son pHi est de 5,2, cependant elle reste stable pour de larges valeurs de pH. L'association des  $\beta$ -lg par des interactions non covalentes et réversibles est fortement dépendante du pH de l'environnement. À un pH compris entre 5,2 (pHi de la  $\beta$ -lg) et 6,8 (pH du lait), la protéine est présente sous forme de dimère stable, tandis qu'entre pH 3,5 et 5,2, la  $\beta$ -lg peut être présente sous une forme d'octamérique stabilisée par des liaisons hydrogènes. Au-delà de ces pH (< 3,5 et > 6,8), un phénomène de répulsions électrostatiques a lieu au sein des structures, ce qui engendre la dissociation des octamères et dimères pour former des monomères. Entre pH 7 et 8, un groupement thiol, un carboxylate et une tyrosine sont exposés suite à un changement de conformation appelé transition de Tanford. Finalement, pour des pH > 9, la  $\beta$ -lg se dénature irréversiblement par échanges de ponts disulfures, tandis que la structure native de la  $\beta$ -lg est conservée jusqu'à pH 2 (Gaucheron 2004; Laneuville 2004).

Finalement, l' $\alpha$ -la possède un pHi de 4,2, mais à partir de pH 5,0, son site de fixation de l'ion calcium formé par quatre résidus d'aspartate se charge positivement, et perd alors sa capacité à fixer l'ion. L'ion calcium étant nécessaire au maintien de la structure tertiaire de la protéine, une dénaturation est alors possible. Pour des valeurs de pH acide, l' $\alpha$ -la prend une conformation appelée « *molten globule state* » dû à la perte de sa structure tertiaire. Une association des monomères d' $\alpha$ -la ainsi qu'une agrégation est observée pour des valeurs de pH < 4,5. Cependant cette association est lente et réversible. Pour des pH compris entre 6,0 et 8,5 l'association entre les monomères est très faible, tandis que pour un pH de 9,5, aucune association n'est observée (Boland *et al.*, 2014; Gaucheron 2004).

## **2.4.2 Dénaturation par les agents physiques**

### **2.4.2.1 Généralités**

La dénaturation par un agent physique comprend plusieurs étapes (Fig. 12). Suite à un apport énergétique (température, pression, etc.) la protéine passe d'un état natif à un état « pré-dénaturé » puis « déplié » et ce, par modification des réactions intramoléculaires. A partir de cet état « déplié », la molécule va pouvoir s'agréger (Fig. 12, flèche verte) par le biais d'interactions intermoléculaires. Selon les conditions de dénaturation, les agrégats peuvent être sous forme amorphe, oligomérique ou bien fibrillaire. En parallèle à l'agrégation des protéines, leur niveau d'hydratation va diminuer induisant ainsi une diminution de la solubilité.

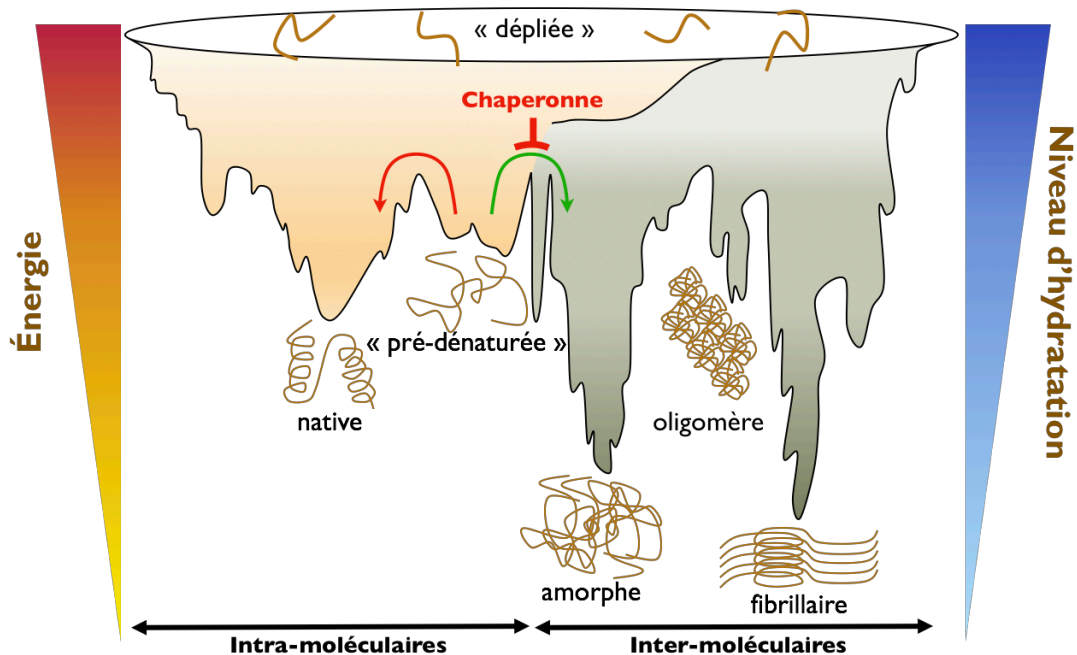


Figure 12. Paysage énergétique de dépliement et d'agrégation d'une protéine (anglais - folding and misfolding protein energy landscape). Selon le niveau d'énergie apporté par un traitement, la protéine va interagir avec elle-même par des liaisons intra-moléculaires. Lorsque la protéine atteint un état « déplié », elle va être sujette à des réactions inter-moléculaires résultant en une agrégation sous formes amorphe, oligomérique et fibrillaire. Finalement le changement de conformation de la protéine entraîne une modification de son niveau d'hydratation, Tiré et adapté de Muntau, Leandro, Staudigl, Mayer and Gersting (2014) et Kim, Hipp, Bracher, Hayer-Hartl and Ulrich Hartl (2013).

#### 2.4.2.2 Dénaturation des protéines sériques par les traitements thermiques

Comparativement aux CN, les protéines de lactosérum possèdent une structure secondaire et tertiaire très développée (hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ ) et sont donc beaucoup plus sensibles à la dénaturation thermique. Parmi les protéines du lactosérum, la  $\beta$ -lg est la plus sensible aux traitements de chaleur. Son agrégation dépend de nombreux facteurs tels que le pH, la concentration en protéines, la force ionique et même la présence d'autres protéines. Mais globalement, selon Wijayanti, Brodkorb, Hogan and Murphy (2019), l'agrégation de la  $\beta$ -lg se déroule selon les 4 étapes suivantes :

- **Dissociation** des dimères et formation de monomères ;
- **Déplie**ment des monomères exposant ainsi leurs résidus hydrophobes et groupement thiol libre qui devient alors réactif ;
- **Agrégation** par échange inter-groupement -SH/S-S- et réactions non covalentes entre les monomères réactifs. L'utilisation de températures entre 65 et 85 °C favoriserait les réactions non-covalentes, tandis que les températures supérieures à 85 °C favorisent les réactions covalentes ;
- **Polymérisation** et formation d'agrégats de hauts poids moléculaires par l'intermédiaire de liaisons covalentes. Dans certaines conditions, cette étape peut entraîner la formation d'un gel.

Ces quatre étapes sont très similaires pour la dénaturation des autres protéines, mais varient tout de même selon leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques. La dénaturation thermique de l' $\alpha$ -la est réversible jusqu'à des températures de 80 °C (90 % de réversibilité contre 40 % pour un traitement de 95 °C – 15 min). Son agrégation thermique est largement dépendante de la présence de l'ion calcium ainsi que de la présence d'un groupement thiol libre réactif dans la solution. La SAB est connue pour ses propriétés gélifiantes importantes. Sa dénaturation thermique irréversible est majoritairement due à une agrégation hydrophobe. Cependant, en présence d'autres protéines, elle peut être impliquée dans des agrégats covalents par échanges inter -SS/SS-. Finalement dans le cas des Ig, leur agrégation est principalement due à des réactions covalentes pour des températures de l'ordre de 100 °C tandis qu'à 72 °C, ce sont des réactions non covalentes qui sont majoritaires (Paul *et al.*, 2013; Wijayanti *et al.*, 2019). Les effets des traitements thermiques observés sur les protéines du lactosérum sont souvent comparés à ceux induits lors de traitement par les HPH.

#### 2.4.2.3 Dénaturation des protéines laitières par les HPH

Le mécanisme de dénaturation des protéines laitières sous hautes pressions inclut des étapes de dissociation, de déplie

Deeth 2019). Cependant, l'impact des HPH sur les protéines dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi que de la composition et concentration protéique de la solution.

#### **2.4.2.3.1 Impact sur les CN**

Alors que plusieurs études se sont penchées sur l'effet des HPH sur les CN sous forme de micelles, très peu d'étude ont porté sur les différents types de CN. Selon le niveau de pressurisation appliqué, les effets observés sur la micelle de CN varient considérablement (Fig. 13). À 20 °C, les CN sont ainsi peu affectées par des pressions inférieures à 100 MPa. Jusqu'à 250 MPa, une augmentation de la taille des CN est observée, puis de 280 à 400 MPa, le traitement induit une réduction de la taille des micelles (Altuner, Alpas, Erdem & Bozoglu 2006; Bravo *et al.*, 2015; Considine, Patel, Anema, Singh & Creamer 2007a; Gebhardt, Doster, Friedrich & Kulozik 2006; Patel *et al.*, 2006). Harte, Gurram, Luedecke, Swanson and Barbosa-Cañovas (2007), expliquent ce phénomène par la désagrégation des micelles de CN pour former des micelles de plus petites tailles. Cette désagrégation est due principalement à la déstabilisation des ponts phosphocalciques et des liaisons hydrophobes qui maintiennent la structure native des micelles de CN (Boland *et al.*, 2014). La déstabilisation de la micelle de CN est induite en début de traitement de pressurisation par la solubilisation du calcium micellaire. En effet, le bris des interactions ioniques ( $\Delta V_{\text{dissociation}}$ ) est favorisé, induisant ainsi une désagrégation des nanoclusters de phosphate de calcium responsables de l'intégrité des micelles de CN (Huppertz, Fox, De Kruif & Kelly 2006). La réassociation des CN sous forme de micelles est possible pour des pressions < 300 MPa par le biais d'interactions hydrophobes. Pour des pressions > 300 MPa, la réassociation des CN sous forme de micelles n'est plus observée. Selon Huppertz, Fox, *et al.*, (2006), cela peut être causé par la solubilisation totale du phosphate de calcium induisant la perte de structure des nanoclusters.

Récemment, Cadesky, Walkling-Ribeiro, Kriner, Karwe and Moraru (2017) ont démontré une diminution de la solubilisation du phosphate de calcium pour les pressions > 450 MPa. À ces pressions, le phosphate de calcium serait solubilisé sous une forme de phosphate tricalcique qui interagirait ensuite de manière spécifique avec les  $\alpha_s$ -CN pour former des agrégats non solubles.



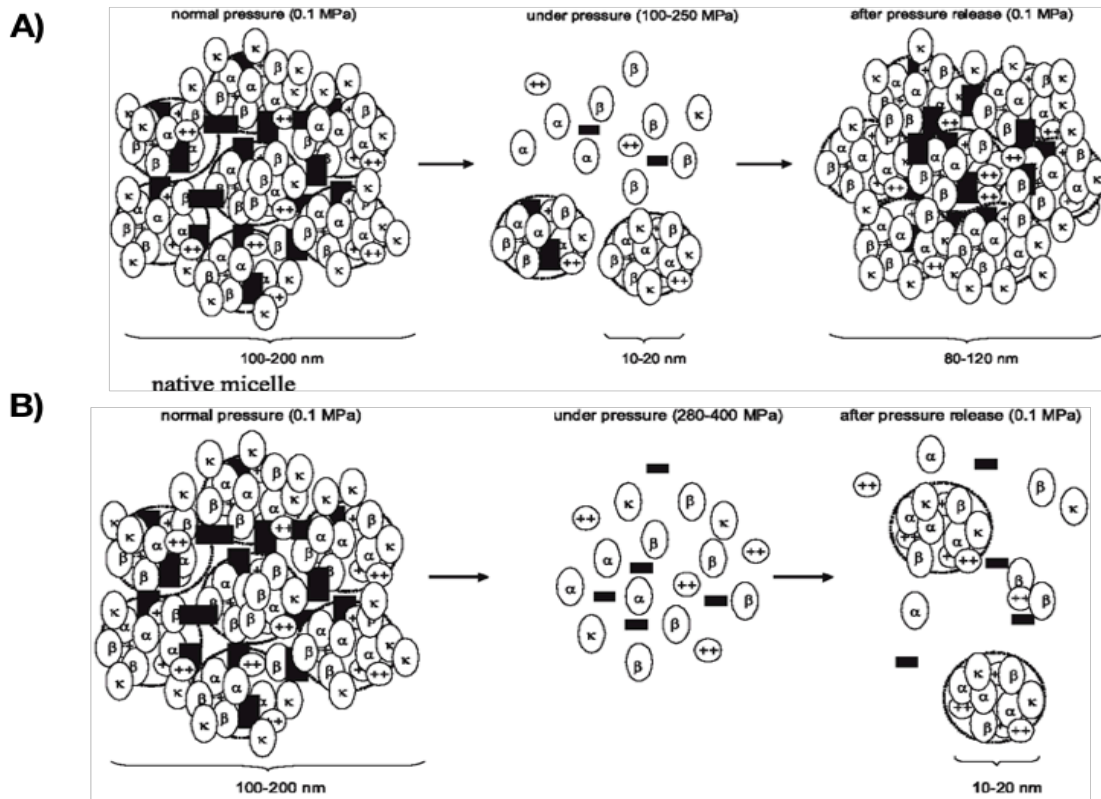


Figure 13. Modification de la taille et de la structure des micelles de caséines (CN) suite à un traitement de hautes pressions hydrostatiques de A) 100 à 250 MPa et B) 280 à 400 MPa à 20 °C. Tiré avec permission de Gebhardt et al., (2006).

Les modifications (augmentation ou diminution) de la taille des micelles de CN dépendent de nombreux facteurs tel que présenté dans le Tableau 9. En effet, la température de traitement, le pH et le temps de traitement (< 250 MPa) induisent une augmentation de la taille des micelles de CN plus importante, alors que la présence de protéines sériques influe peu sur ce paramètre. De plus, l'élévation du pH du lait ralentit la formation de micelles de plus petites tailles, tandis que les autres facteurs n'ont que très peu d'influence sur la diminution des micelles par les HPH.

Tableau 9. Facteurs influençant les modifications de tailles des micelles de CN par les HPH. Tiré de Huppertz, Fox, et al., (2006).

Facteurs	Effets sur l'augmentation de la taille des micelles par les HPH	Effets sur la diminution de la taille des micelles par les HPH
Température de traitement	Augmentation de la taille	Peu d'influence
Temps de traitement	Augmentation de la taille avec l'augmentation du temps à 250 MPa mais pas à 300 MPa	Peu d'influence
pH du lait	Augmentation de la taille à pH plus élevés	Désagrégation de la micelle plus faible à pH élevé
Présence de protéines sériques	Peu d'influence	Peu d'influence

#### 2.4.2.3.2 Impact sur la $\beta$ -lg

La  $\beta$ -lg est la protéine sérique la plus sensible aux HPH de par sa structure secondaire plus lâche (nombre de ponts disulfures inférieurs aux autres protéines sériques) ainsi que la présence d'un résidu thiol libre, initiateur de l'agrégation (Huppertz, Fox, et al., 2006; Huppertz et al., 2019). Plus la concentration en  $\beta$ -lg native est importante, plus le taux dénaturation sera conséquent (Boland et al., 2014). Dès 50 MPa, l'analyse de la réactivité du groupement thiol suggère une configuration « pré-dénaturée » de la  $\beta$ -lg qui correspond à une structure partiellement dépliée et donc réversible (Boland et al., 2014). Cependant, en dessous de 100 MPa, le groupement thiol libre (Cystéine 121) n'est pas encore exposé empêchant les réactions d'échange de ponts disulfures (Considine et al., 2007a). À 200 MPa, près de 16 % des  $\beta$ -lg sont dénaturées, pour atteindre près de 80 % à 400 MPa. A ce stade, la présence de dimères et d'oligomères suite à des échanges intra- et intermoléculaires entre les groupements SH/S-S est observée (Fig. 6). La proportion des oligomères augmente avec la durée de pressurisation (Funtenberger, Dumay & Cheftel 1997a). Un traitement de pression supérieure à 400 MPa entraîne la dénaturation complète et irréversible de la  $\beta$ -lg et la formation d'agrégats solubles (Considine et al., 2007a). Les agrégats obtenus sont caractérisés par des poids moléculaires compris entre 36 (dimère) et 108 kDa (hexamères) (Funtenberger, Dumay & Cheftel 1995). Néanmoins, la présence d'un ligand hydrophobe tel que du SDS (sodium-dodecyl sulfate) ou ANS (1-anilino-8-naphtalènesulfonate) a permis de montrer un dépliement et donc une dénaturation et agrégation

plus tardif de la  $\beta$ -lg sous HPH, en comparaison avec une protéine seule (Considine *et al.*, 2007a).

Récemment, Meng, Bai, Gao, Li and Chen (2017) ont analysé les modifications structurales (primaire, secondaire et tertiaire) de la  $\beta$ -lg (0,04 %) pressurisées 30 min à 100, 200, 300, 400 et 500 MPa (pH 6,8). Comme observé précédemment, la structure primaire (enchaînement des acides aminés) de la  $\beta$ -lg n'a pas été affectée par le traitement. Cependant, alors que les liaisons hydrogènes, à l'origine de la structure secondaire (hélices  $\alpha$ , feuilletts  $\beta$ , etc.) des protéines ne sont impactées que par des pressions supérieures à 400 MPa, les auteurs n'ont pas observé de modification de la structure secondaire de la  $\beta$ -lg, et ce, même à 500 MPa (Rivalain *et al.*, 2010). À l'inverse, l'intensité de fluorescence intrinsèque (généralement utilisée pour caractériser la structure tertiaire – dépliement des protéines) augmentait avec la pression. Cela suggère donc que la protéine se déplie sous l'effet des HPH et expose ainsi ses groupements hydrophobes. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de l'hydrophobicité de surface qui s'est vue largement augmentée avec l'augmentation de la pression (Meng *et al.*, 2017).

Contrairement à l'étude précédente, Kurpiewska *et al.*, (2018) ont observé une modification de la structure secondaire de la  $\beta$ -lg. En effet, après pressurisation à 430 MPa et à pH 7,0, le pourcentage de structure aléatoire augmentait au détriment des feuilletts  $\beta$  et hélices  $\alpha$ . À partir de 200 MPa, la poche hydrophobe prenait une conformation dite « ouverte » ou « état gonflé » qui permet l'interaction avec de nombreux ligands hydrophobes. À la décompression, la protéine a repris une structure différente dont la conformation serait majoritairement due à l'exposition des régions hydrophobes et non aux changements inter-groupements -SH/-S-S-. Néanmoins, le résidu de thiol libre réactif est lui aussi mis à disposition pour la formation d'agrégats (Bravo, Felipe, Lopez-Fandino & Molina 2013; Bravo *et al.*, 2015; Considine *et al.*, 2007a; Huppertz, Fox & Kelly 2002; Mazri *et al.*, 2012).

La pressurisation induit ainsi une structure plus lâche (observé par DLS – *dynamic light scattering*). En effet, Kurpiewska *et al.*, (2018) ont observé une diminution du diamètre

hydrodynamique des dimères de  $\beta$ -lg sous hautes pressions, passant de 6,8 nm à 6,6 nm à pression atmosphérique. De plus, le traitement par HPH est responsable d'une altération de la charge globale de la protéine caractérisée par une diminution importante du potentiel zêta et ceux dû à l'exposition de nouveaux groupements chargés à la surface de la protéine. Il est aussi possible que la charge nette de la protéine soit modifiée par des traitements de pressurisation. En effet, Orlien, Olsen and Skibsted (2007) ont démontré que la pressurisation (300 MPa) à pH 4, d'une solution modèle de  $\beta$ -lg entraînait une augmentation du pH de 1,5 unité. Cela est expliqué par l'augmentation du niveau d'hydratation de la protéine et par une perturbation des paires d'ions favorisant ainsi les changements conformationnels. Finalement, c'est l'association des groupements carboxyliques ( $\text{COO}^-$ ) avec les protons ( $\text{H}^+$ ) de l'eau qui entraîne une augmentation du pH. Pour des pressions allant de 300 MPa à 500 MPa, la perte de structure tridimensionnelle de la  $\beta$ -lg entraîne une diminution du pH par dissociation des groupements  $\text{COOH}$  précédemment formés.

#### **2.4.2.3.3 Impact sur l' $\alpha$ -la**

Comparativement à la  $\beta$ -lg, l' $\alpha$ -la démontre une meilleure résistance aux HPH (Bravo *et al.*, 2013, 2015; Considine *et al.*, 2007a; Huppertz *et al.*, 2002; Mazri *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2006). Cette spécificité est expliquée par les caractéristiques structurales de la protéine, notamment au fait qu'elle ne contient pas de groupement thiol libre et que ses 4 ponts disulfures (2 dans le cas de la  $\beta$ -lg) lui assurent une stabilité accrue et une compaction plus importante. L'état « pré-dénaturé », observé dès 50 MPa pour la  $\beta$ -lg, est atteint à 200 MPa pour l' $\alpha$ -la, quant à la dénaturation, elle débute à partir de 400 MPa, contre 200 MPa pour la  $\beta$ -lg. La formation d'agrégats d' $\alpha$ -la pure par échange S-S intramoléculaire n'a lieu qu'à partir de 800 MPa. Cependant, en présence d'un groupement thiol libre réactif provenant d'une autre molécule (telle que la  $\beta$ -lg, présente en majorité dans le lactosérum), l'oligomérisation de l' $\alpha$ -la est possible.

La plus grande résistance de l' $\alpha$ -la aux HPH est aussi due à la présence de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Boland *et al.*, 2014; Huppertz *et al.*, 2019). En effet lorsque l' $\alpha$ -la est sous sa forme apo- (privée de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ ), la pressurisation engendre un dépliement plus important que lorsqu'elle se trouve sous sa

forme holo-. La dénaturation de la forme apo- débute alors 200 MPa plus bas que la forme holo-, soit vers 220 MPa. De plus, l'accès à l'intérieur de la protéine par les molécules de solvant est largement restreint par la présence de l'ion calcium. De ce fait, lors de la décompression, la structure secondaire de l'apo- $\alpha$ -la est modifiée irréversiblement (Dzwolak, Kato, Shimizu & Taniguchi 1999). À pression atmosphérique, les formes apo- $\alpha$ -la et holo- $\alpha$ -la présentent des structures secondaires distinctes. Ainsi, sous pression l'apo- $\alpha$ -la est sujette à de nombreuses modifications structurales entre 100 et 250 MPa signifiant un dépliement de la protéine très rapide tandis que les modifications structurales de l'holo- $\alpha$ -la, sont réparties entre 100 et 900 MPa. Malgré cette différence de vitesse de dénaturation, l'agrégation de l' $\alpha$ -la (quelle que soit sa forme) n'est pas modifiée (Hosseini-Nia, Ismail & Kubow 2002).

Le pH de la solution pressurisée impacte également grandement sur le processus de dénaturation de l' $\alpha$ -la. En effet, Rodiles-Lopez *et al.*, (2010) ont démontré que la pressurisation d'une solution d' $\alpha$ -la (5 %) à pH 3, 5, 7 et 9 entraînait des propriétés structurales différentes. La fluorescence intrinsèque (généralement utilisée pour caractériser le dépliement des protéines) avant pressurisation était 25 % plus élevée à pH 3, signifiant une exposition plus importante des résidus hydrophobes due au pH acide. Après pressurisation, l'intensité d'absorbance et la longueur d'onde d'émission maximale à pH 3 n'était pas différente du témoin (absence de pressurisation). À l'inverse, les pH 5, 7 et 9 entraînaient une diminution de l'intensité d'absorbance et de la longueur d'onde d'émission maximale suggérant une modification de la conformation plus importante à ces pH. Dans cette même étude, les analyses d'hydrophobicité de surface suivent la même tendance. La pressurisation à pH 3 n'entraînait pas de modification de l'hydrophobicité de surface tandis qu'à pH 5, 7 et 9, l'hydrophobicité augmentait lors de la pressurisation. Cela confirme donc une exposition des groupements hydrophobes et donc un dépliement plus important de la protéine à ces valeurs de pH. Finalement, l'analyse par dichroïsme circulaire à UV lointain a permis de mettre en évidence que la pressurisation (jusqu'à 600 MPa – 55 °C – 10 min) à pH 7 permettait de conserver intégralement la structure secondaire (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  et structure aléatoire) de la protéine. Inversement, dans les mêmes conditions de pressurisation, à pH 3 et 5, les feuillets  $\beta$  étaient favorisés comparativement aux hélices  $\alpha$  (Dzwolak *et al.*, 1999; Rodiles-Lopez *et al.*, 2010).

#### **2.4.2.3.4 Impact sur un mélange d' $\alpha$ -la et $\beta$ -lg**

Plusieurs études sur l'impact des HPH sur un mélange de protéines laitières (Bravo *et al.*, 2015; Mazri *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2006), ont montré que la composition des agrégats formés était dépendante du niveau de pression, du temps et de la température. En effet, les molécules d' $\alpha$ -la étant moins sensibles aux HPH, pour des pressions inférieures à 300 MPa, les agrégats formés sont essentiellement des agrégats homogènes de  $\beta$ -lg. A ces pressions, les interactions  $\alpha$ -la/ $\beta$ -lg sont générées par liaisons hydrophobes. Pour des pressions supérieures à 600 MPa, la présence de  $\beta$ -lg induirait l'oligomérisation de l' $\alpha$ -la et provoquerait une large gamme d'agrégats homogènes ( $\alpha$ -la ou  $\beta$ -lg) et hétérogènes ( $\alpha$ -la/ $\beta$ -lg en diverses proportions) associés de manière covalente (Boland *et al.*, 2014; Grinberg & Haertlé 2000). Finalement, à 800 MPa, plus de 80 % de dénaturation de la  $\beta$ -lg contre 40 % pour l' $\alpha$ -la a été observé (Considine *et al.*, 2007a).

#### **2.4.2.3.5 Impact des HPH sur un mélange d' $\alpha$ -la, $\beta$ -lg et CN**

Contrairement aux observations effectuées sur la pressurisation des CN seules, après traitement aux HPH de 150 à 300 MPa sur du lait, Knudsen and Skibsted (2010) ont observé la présence de deux populations de micelles de CN : 1) des particules de tailles beaucoup plus petites (20 à 50 nm) et 2) des micelles de taille très larges (> 200 nm). À 400 MPa, les tailles des particules observées étaient toutes comprises entre 30 et 100 nm de diamètre.

En plus des modifications de la taille des micelles de CN, les traitements de HPH d'un mélange composé de protéines sériques et de CN, engendrent des agrégats hétérogènes variés et ce, faisant intervenir différentes interactions de types hydrophobes ou covalentes. Une interaction spécifique entre la  $\kappa$ -CN et la  $\beta$ -lg est observée. Cette agrégation est due à la présence d'un pont disulfure dans la structure de la  $\kappa$ -CN et de l'accessibilité au groupement thiol libre réactif de la  $\beta$ -lg (Considine *et al.*, 2007a; Patel *et al.*, 2006). Parmi les autres CN, l' $\alpha_{s2}$ -CN possède aussi un pont disulfure, favorisant ainsi les interactions avec la  $\beta$ -lg sous traitement de HPH. À l'inverse, cette agrégation n'est généralement pas observée lors d'un traitement thermique inférieur à 90 °C

(Huppertz *et al.*, 2019). L'association de la  $\beta$ -lg avec les CN augmente avec l'élévation de la pression, l'augmentation du temps et de la température de pressurisation ainsi que du pH de pressurisation (Considine *et al.*, 2007a). Pour des pressions  $> 250$  MPa, la taille des particules diminue plus rapidement avec la diminution du pH, tandis qu'au-dessus de 500 MPa, la diminution de la taille ne dépend plus que du niveau de pression (Considine *et al.*, 2007a). Globalement, pour des pressions supérieures à 400 MPa, l'agrégation des protéines suit le mécanisme de dénaturation de la  $\beta$ -lg (Huppertz *et al.*, 2019).

Contrairement à la  $\beta$ -lg, l' $\alpha$ -la dénaturée est présente majoritairement dans la phase soluble et non dans les agrégats avec les CN, et ce, jusque 800 MPa. À partir de cette pression, les autres protéines mineures du lactosérum (plus particulièrement les Ig et la Lf) sont retrouvées dans les agrégats de  $\beta$ -lg,  $\kappa$ -CN et  $\alpha_{s2}$ -CN (Huppertz *et al.*, 2019). En effet, selon Huppertz, Fox and Kelly (2004a), les protéines sériques dénaturées sont alors sédimentables suggérant leur association avec les CN. De ce fait, Huppertz, Fox and Kelly (2004b) démontrent qu'un traitement de 600 MPa pendant 30 min sur du lait, engendrent une dénaturation de la  $\beta$ -lg de  $95,7 \pm 4,1$  % contre  $25,6 \pm 7,5$  % pour l' $\alpha$ -la. Plus récemment, Bravo *et al.*, (2015) ont mis en avant une diminution de la solubilité de la Lf pour des pressions  $> 550$  MPa, tandis que de 250 à 700 MPa, la solubilité des Ig diminue avec l'augmentation de la pression. Par ailleurs, des traitements de HPH de 700 à 900 MPa n'entraînaient pas de modifications majeures au niveau des CN, bien que les protéines sériques ( $\beta$ -lg, Ig et Lf) subissaient une dénaturation sévère.

L'agrégation des protéines est généralement responsable d'une perte de leurs propriétés fonctionnelles engendrant indirectement de nombreuses problématiques en industrie laitière (colmatage des échangeurs de chaleurs, etc.). Il est donc primordial de continuer à étudier leur stabilité face aux agents de dénaturation ainsi que de mettre en place des stratégies pour conserver cette stabilité. Dans les dernières années, l'utilisation de molécules chaperonnes semble être une voie intéressante pour l'inhibition de l'agrégation des protéines sériques (Huppertz *et al.*, 2019; Kelly 2019; Wijayanti *et al.*, 2019). Dans cette optique, He *et al.*, (2011) ont démontré que suite à un traitement aux HPH, les  $\alpha_s$ -CN présentent un rôle similaire à celui qu'exercent les protéines chaperonnes. La présence de l' $\alpha_s$ -CN dans un mélange pressurisé

contenant de la  $\beta$ -lg permet la stabilisation des agrégats de  $\beta$ -lg et leur solubilisation en se fixant au niveau de la poche hydrophobe de la  $\beta$ -lg diminuant ainsi son agrégation.

### 2.4.3 Effet chaperon des caséines

#### 2.4.3.1 Généralités

En plus de leurs propriétés fonctionnelles reconnues, certaines CN présentent une propriété bien particulière de protéine chaperonne (en anglais *chaperone protein*). Le terme molécule chaperonne a été utilisé pour la première fois par Laskey *et al.*, (1978) puis décrit plus spécifiquement par John Ellis (1989) comme étant une classe de protéines cellulaires dont la fonction principale est d'assurer que le repliement et l'assemblage des chaînes polypeptidiques se déroule de manière optimale (Ellis 1987). Il s'agit donc d'un mécanisme cellulaire déclenché en réponse à un stress, permettant aux protéines cibles d'assurer leurs rôles biologiques par la conservation de leurs structures tridimensionnelles. Alors qu'il s'agit avant tout d'une fonction biologique, le terme *chaperone-like protein* est lui principalement utilisé pour caractériser des protéines non cellulaires ayant un rôle similaire à celles retrouvées dans les mécanismes cellulaires. Tout au long de ce manuscrit, le terme « protéines chaperonnes » correspondra au terme anglophone plus précis de *chaperone-like protein*. Selon la littérature, une protéine chaperonne doit alors répondre à au moins l'un des critères suivants :

- Capacité de **protéger la protéine cible de l'agrégation lors de son dépliement** sous conditions de stress ;
- Capacité à **inhiber l'agrégation durant le repliement** de la protéine à partir de son état dénaturé ;
- Capacité à **conserver l'activité biologique** de la protéine cible.

Et ce, en interagissant de manière non-covalente avec la protéine cible, sans faire partie de la structure finale des agrégats (Fig. 14)(Hartl, Bracher & Hayer-Hartl 2011; He *et al.*, 2011)



Parmi les CN, les  $\alpha_{s1}$ -CN, et  $\beta$ -CN sont les plus étudiées pour leurs propriétés chaperonnes. En effet, leur caractère très hydrophobe ainsi que leur structure lâche leur permettent ainsi de réagir de manière non-covalente et non spécifique avec de nombreuses protéines (Akbari, Bamdad & Wu 2018; Yong & Foegeding 2008, 2010).

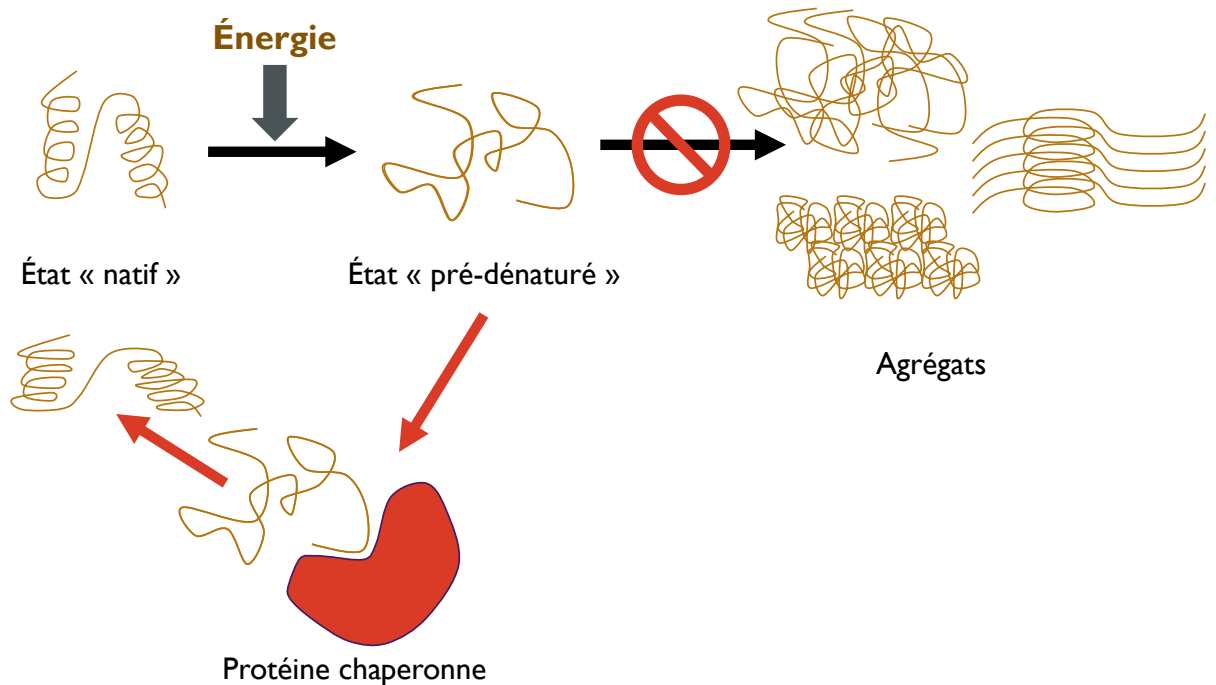


Figure 14. Mécanisme d'action d'une protéine chaperonne sur l'agrégation/dénaturation de la protéine cible.

Alors que les procédés de transformations alimentaires sont souvent responsables d'agrégation et donc potentiellement de dénaturations protéiques non désirées, l'utilisation de protéines alimentaires présentant une activité chaperonne semble être une voie intéressante, particulièrement dans l'industrie des boissons enrichie en protéines où la turbidité est associée à une agrégation (Akbari *et al.*, 2018).

#### 2.4.3.2 Effet sur l'agrégation des protéines sériques

Le Tableau 10 recense l'ensemble des études portant sur l'effet des CN comme protéine chaperonne sur l'agrégation des protéines sériques. Très peu d'études ont porté sur ce sujet puisque l'application des protéines chaperonnes hors du domaine de la biologie est assez récent. Ces études portent majoritairement sur l'agrégation thermique des protéines, plus spécifiquement la  $\beta$ -lg.

De manière générale, il en ressort un caractère concentration-dépendant de la protéine chaperonne. En effet, l'augmentation de la concentration de la CN ( $\alpha_s$ -CN ou  $\beta$ -CN) permet de diminuer radicalement voire inhiber la turbidité des solutions de protéines sériques. Cette dénaturation est aussi dépendante du pH de la solution ainsi que de sa force ionique, et plus spécifiquement du sel utilisé. Par exemple, Kehoe and Foegeding (2010) ont démontré que l'augmentation de la force ionique diminuerait considérablement l'activité chaperonne de la  $\beta$ -CN, et ce, d'autant plus avec utilisation de  $\text{CaCl}_2$  (en comparaison avec l'utilisation de  $\text{NaCl}$ ). Également, la diminution du pH diminuerait l'activité chaperonne de ces protéines (Liyanaarachchi, Ramchandran & Vasiljevic 2015; Liyanaarachchi & Vasiljevic 2018).

Parmi ces études, une seule a été publiée spécifiquement sur l'effet chaperon suite à un traitement de HPH. A plus haute concentration (0,6 %), l' $\alpha_s$ -CN a permis de diminuer complètement la turbidité d'une solution de  $\beta$ -lg, et ce, même après un traitement de 10 min à 800 MPa (He *et al.*, 2011).

Tableau 10. État de l'art concernant l'effet chaperons des caséines (CN) sur l'agrégation des protéines sériques selon les paramètres utilisés. Tiré et adapté de Akbari et al., (2018) et Yong and Foegeding (2010).

Type de CN (en %)	Protéine cible (en %)	Paramètres d'utilisation	Résultats obtenus	Références
$\alpha_s$ -CN (0,4 – 0,6)	$\alpha$ -la (0,2) et $\beta$ -lg (0,2)	70 °C / 5 min pH 7	Formation d'agrégats solubles non visible par spectroscopie Diminution de l'agrégation en présence d' $\alpha_s$ -CN (0,4 %)	Bhattacharyya and Das (1999)
Caséinate de sodium, $\beta$ -CN et $\alpha_{s1}$ -CN	$\beta$ -lg sous forme d'émulsion	90 °C / 3min	Inhibe les effets du traitement thermique (viscosité et augmentation de la taille des particules).	Dickinson and Parkinson (2004) Dickinson and Parkinson (2004)
$\alpha_s$ -CN (0 – 0,5) $\alpha_s$ -CN (0 – 0,12)	$\beta$ -lg (0,5) $\alpha$ -la (0,2)	70 °C / 480 min 25 – 37 °C / 360 min + DTT	Diminution de la turbidité des solutions avec augmentation de la concentration en $\alpha_s$ -CN	Morgan, Treweek, Lindner, Price and Carver (2005)
$\alpha_{s1}$ -CN + $\beta$ -CN (0,05 – 0,5)	IPL (0,5)	85 °C / 1 – 10 min pH 5,55 – 6,4	Diminution de la turbidité des solutions à 0.5 % de $\alpha_{s1}$ -CN / $\beta$ -CN particulièrement à pH > 6	O'kennedy and Mounsey (2006)
$\beta$ -CN (0,01 – 2) $\alpha_s$ -CN (2)	$\beta$ -lg (6)	70 – 90 °C / 20 min pH 6	Diminution de la turbidité des solutions à partir de 0.05 % de $\beta$ -CN (de 70 à 90°C) Diminution de la turbidité des solutions avec $\alpha_s$ -CN à 70 °C	Yong and Foegeding (2008)
$\kappa$ -CN (0 – 1) Caséinate de sodium (0 – 5)	IPL (0 – 2,5)	80 °C / 24 h NaCl 0,1 M / pH 7	Diminution de la taille des agrégats lors de l'utilisation de caséinate de sodium Diminution de l'agrégation plus importante avec la $\kappa$ -CN	Guyomarc'h, Nono, Nicolai and Durand (2009)
$\alpha_s$ -CN et $\beta$ -CN (0,02 – 0,2)	$\alpha$ -la (0,2)	37 °C / 360 min DTT	Protection de la dénaturation par DTT de l' $\alpha$ -la en fonction de la concentration de CN Importance des groupements phosphorylés	Koudelka, Hoffmann and Carver (2009)
$\alpha_s$ -CN (0 – 0,6)	$\beta$ -lg (0,2)	400 – 800 MPa 30 °C / 5 – 60 min	Diminution de la turbidité avec augmentation de la concentration en CN. Inhibition de l'agrégation à haute	He et al., (2011)

$\beta$ -CN (2)	$\beta$ -lg, $\alpha$ -la ou SAB (10)	NaCl ou CaCl <sub>2</sub> (500 mM) 110–145 °C / 1 min	concentration même à 800 MPa Diminution de la turbidité des solutions de $\beta$ -lg, $\alpha$ -la et SAB, Activité dépend du pH et de la force ionique Ajout de CaCl <sub>2</sub> a plus d'effet que NaCl	Kehoe and Foegeding (2010)
CN	IPL et CPL	80 – 120 °C / 1 min pH 5,7, 6,7 et 7,5 solides totaux 10 %	Diminution de la taille des agrégats et de la viscosité à pH 6.7 Inhibition de la dénaturation des protéines à pH élevé Réactions hydrophobes sont prédominantes	Liyanaarachchi <i>et al.</i> , (2015) Liyanaarachchi and Vasiljevic (2018)
ratios CN/IPL – CPL 5/95, 10/90, 20/80 et 30/70				

---

IPL : isolat de protéines de lactosérum; CPL : concentré de protéines laitières

### 2.4.3.3 Controverse autour des protéines chaperonnes

Comme mentionné précédemment, le terme de protéine chaperonne ainsi que sa définition ont initialement été décrits dans un contexte biologique et correspondent ainsi à une activité cellulaire. C'est donc dans le but de distinguer ces deux applications (cellulaire et non-cellulaire) que l'utilisation du terme anglophone « *chaperone-like protein* » a été instaurée.

Par ailleurs, l'activité chaperonne d'une protéine est très généralement évaluée par mesure de turbidimétrie suggérant ainsi une relation linéaire entre turbidité et agrégation protéique (Bhattacharyya & Das 1999; Hall *et al.*, 2016; He *et al.*, 2011; Yong & Foegeding 2010). L'ensemble des études portant sur l'effet chaperon des CN présentées dans ce manuscrit repose sur la mesure de turbidité des solutions suivant la Loi de Beer Lambert. Cette loi permet de décrire l'absorption de tout rayonnement par la matière condensée et ainsi suggère une proportionnalité entre la concentration d'une entité chimique et la longueur du trajet parcouru par la lumière.

Cependant, très récemment, Hall *et al.*, (2016) ont démontré que la corrélation entre turbidité et agrégation protéique n'était pas linéaire puisque celle-ci dépend de plusieurs paramètres. En effet, le poids moléculaire, la forme (amorphe, globulaire ou fibrillaire) et le volume de l'agrégat ainsi que la différence d'indice de réfraction entre les particules et le solvant, sont autant de paramètres pouvant influencer la turbidité d'une solution (Fig. 15).

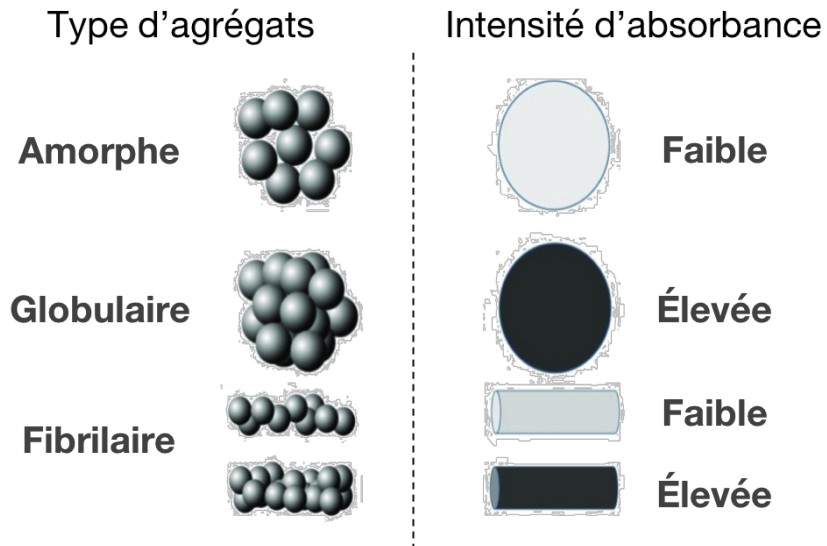


Figure 15. Différence d'intensité d'absorbance par spectroscopie (généralement mesuré avec  $\lambda=360, 395$  et  $600 \text{ nm}$ ) selon le type d'agrégats. Tiré et adapté de Zhao et al., (2016) et Hall et al., (2016).

Ainsi, de nombreuses études sur le sujet sont encore nécessaires afin de mieux caractériser l'activité chaperonne dans un contexte non-cellulaire et ainsi contribuer à une meilleure compréhension du mécanisme d'action de ces protéines.

### **3 Problématique, hypothèse et objectifs de recherche**

#### **3.1 Problématique**

Bien que le lactosérum soit un coproduit largement connu, la séparation de ses protéines pour obtenir des fractions pures d' $\alpha$ -la et de  $\beta$ -lg est une problématique toujours d'actualité dans un contexte économique, nutritionnel et fonctionnel. La problématique essentielle étant que *les procédés matures actuellement disponibles à l'échelle industrielle, tels que les procédés membranaires, et d'échange ionique présentent des défis environnementaux et technologiques dans le cas du fractionnement de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg*. Le développement d'une nouvelle approche pour le fractionnement de ces protéines est alors nécessaire.

Alors que le couplage de technologies s'avère intéressant pour obtenir des taux de purification plus élevés, l'utilisation de technologies émergentes (telles que les HPH) s'avère une solution verte et douce comparativement aux procédés conventionnels. Bien que l'effet des HPH sur les protéines laitières soit supporté par la littérature, *la contribution de cette technologie et le couplage avec l'utilisation d'un ligand pour moduler des interactions protéiques et des agrégats spécifiques, et leurs conséquences sur le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg reste à étudier*.

#### **3.2 But et hypothèse**

Comme mentionné précédemment, l'application des HPH sur les protéines laitières permet de favoriser certaines interactions protéiques ainsi que la formation d'agrégats spécifiques. Ainsi, en lien avec les effets des HPH sur les structures protéiques laitières, tel que cités précédemment, il s'avère qu'un traitement par les HPH permet de moduler des interactions spécifiques ( $\beta$ -lg/CN). Le but de ce projet est donc *d'utiliser le procédé des HPH afin d'engendrer des modifications structurales protéiques spécifiques permettant d'améliorer le fractionnement de protéines de poids moléculaires similaires*.

L'hypothèse générale repose sur le fait que *la différence de barosensibilité des protéines sériques soumises au HPH permet de moduler spécifiquement des interactions protéines-protéines permettant ainsi d'améliorer le fractionnement d'un mélange protéique modèle et complexe par simple acidification subséquente.*

Pour répondre à cette hypothèse, des objectifs et sous objectifs ont été mis en place.

### **3.3 Objectifs de recherche**

L'objectif principal de cette étude est de développer un procédé industriel innovant et eco-efficace pour le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg par l'utilisation des HPH et d'un ligand : les CN, pour obtenir une fraction enrichie en  $\alpha$ -la par simple acidification. Pour cela trois objectifs ont été établis :

Objectif 1 : *Optimiser les paramètres de pressurisation (temps et pression) et du type de CN (isoélectrique – CI ou micellaires – CM) sur un mélange modèle d' $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg et CN pour le fractionnement de l' $\alpha$ -la.*

Objectif 2 : *Évaluer l'effet de la concentration des CN en tant que ligand sur l'agrégation de la  $\beta$ -lg par les hautes pressions pour le fractionnement optimal de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg.*

Objectif 3 : *Caractériser l'activité chaperonne de la  $\beta$ -CN sur l'agrégation de la  $\beta$ -lg sous HPH en présence d' $\alpha$ -la.*



#### 4 The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of alpha-lactalbumin enriched fraction

---

**Marciniak, A., Suwal, S., Britten, M., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2018).** The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of an alpha-lactalbumin enriched-fraction. *Green Chemistry*, 20(2), 515-524.

---

##### Transition contextuelle

Dans la littérature scientifique, l'effet des HPH sur les protéines du lait, plus particulièrement sur la formation d'agrégats hétérogènes spécifiques entre la  $\beta$ -lg et les CN, est largement décrit. Cependant, aucun travail n'a étudié et utilisé ces spécificités pour le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg. Cette étude a donc pour objectif de développer un nouveau procédé de fractionnement des deux protéines majeures du lactosérum, basé sur le procédé des HPH et l'utilisation d'un ligand (les CN). Dans cette étude, les paramètres de pressurisation et le type de ligand ont été optimisés pour obtenir une fraction enrichie en  $\alpha$ -la avec un degré de purification et un rendement le plus élevé.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé :

« **The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interaction for the production of alpha-lactalbumin enriched-fraction** » publié dans « Green Chemistry » en décembre 2017.

Les auteurs sont : Alice Marciniak (candidate au doctorat, planification et réalisation des expériences, analyses des résultats et rédaction de l'article), Shyam Suwal (post-doctorant, correction et révision du manuscrit), Michel Britten (collaborateur scientifique du projet, correction du manuscrit), Yves Pouliot (co-directeur de thèse, supervision scientifique de l'étudiant, correction du manuscrit) et Alain Doyen (directeur de thèse, supervision scientifique de l'étudiant, correction et révision du manuscrit).

## 4.1 Résumé

La valorisation du lactosérum, un coproduit de l'industrie laitière, reste un enjeu majeur. Cependant, au regard de sa haute teneur en protéines, de nombreuses stratégies émergent pour utiliser au mieux ce coproduit. Séparer l'alpha-lactalbumine ( $\alpha$ -la) et la bêta-lactoglobuline ( $\beta$ -lg), les deux protéines majeures du lactosérum, reste un défi lors de sa mise à l'échelle, spécifiquement lorsqu'il est question d'utiliser des technologies vertes, et ce, principalement due à leurs poids moléculaires similaires. Comme approche innovante, nous proposons d'améliorer le fractionnement de ces protéines sériques et la récupération de l' $\alpha$ -la, en utilisant les hautes pressions hydrostatiques (HPH), une technologie verte et émergente, couplée à une acidification à pH 4,6. Pour cela, des solutions protéiques modèles d' $\alpha$ -la, de  $\beta$ -lg et de caséines (CN – isoélectriques, CI et micellaires, CM) ont été traitées aux HPH et acidifiées à pH 4,6. Les rendements et taux de purification en  $\alpha$ -la ont été calculés dans le but d'optimiser les paramètres de HPH (niveau et temps de pression) et le type de CN. Le traitement de pressurisation a induit la formation d'agrégats de  $\beta$ -lg et de CN qui précipitent après acidification à pH 4,6, alors que l' $\alpha$ -la subsistait sous forme soluble. L'analyse des solutions pressurisées avant acidification a montré la formation de deux types d'agrégats : (1)  $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN et une quantité importante de  $\beta$ -lg, principalement liées par des ponts disulfures et (2)  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN et une faible proportion de  $\beta$ -lg, supposément liée par des interactions hydrophobes. La combinaison pression/temps de 600 MPa/300 s a permis d'obtenir la fraction la plus pure en  $\alpha$ -la (86 %) avec un rendement de 77 % en utilisant les CI. Ces travaux effectués sur des solutions laitières modèles ont démontré que l'utilisation d'un procédé de fractionnement basé sur les HPH pourrait être utilisé pour la valorisation du lactosérum par la récupération de protéines à haute valeur ajoutée comme l' $\alpha$ -la.

## 4.2 Abstract

Valorization of whey, a co-product generated from dairy industries, remains an important worldwide problem. However, considering its composition in high value proteins, some technological strategies emerged for its optimal valorization. Separating alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la) from beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg), the two major whey proteins (WP), remains quite challenging to scale up especially using an eco-efficient technology due to their similar molecular weights. As a

novel approach, we proposed to improve the fractionation of these WP and the recovery of  $\alpha$ -la, using high hydrostatic pressure (HHP), an emerging and green technology, combined to acidification to pH 4.6. For this, model protein solutions containing  $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg and casein (CN - isoelectric, IC and micellar, MC), were treated by HHP and acidified to pH 4.6, with the aim of optimising HHP parameters (level of pressure and time) and the type of CN. The pressure treatment rendered  $\beta$ -lg insoluble forming aggregates with CN and precipitates after acidification to pH 4.6, while  $\alpha$ -la remained soluble. Analysis of pressure-treated solutions before acidification showed two main categories of generated-aggregates: (1)  $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN and a large portion of  $\beta$ -lg, mainly linked via disulfide bonds, and (2)  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN and a small amount of  $\beta$ -lg, supposedly linked through hydrophobic interactions. The pressure/time combination of 600 MPa/300 s generated the highest  $\alpha$ -la purification degree (86%) and protein recovery (77%) using IC. Our experiments, performed on model dairy solutions, demonstrated that HHP-based fractionation process could be employed in dairy whey processing for the recovery of highly valuable protein such as  $\alpha$ -la.

### 4.3 Introduction

Whey, a major by-product of dairy processing, has a very high pollutant load due to its organic (lactose, fat and proteins) and inorganic (mineral salts) content (Smithers 2015). Until recently, whey has been directly discharged into waterways, municipal sewage treatment works or into land (Prazeres, Carvalho & Rivas 2012; Smithers 2015). However, restrictions have been imposed on whey disposal because of its high biological oxygen demand (BOD >30,000 mgO<sub>2</sub>/L) and chemical oxygen demand (COD from 60,000 to 80,000 mgO<sub>2</sub>/L), mainly due to lactose and protein content (Smithers 2015). In addition, whey from the dairy industry is of growing interest due to its beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg, molecular weight (MW) 18,600 Da) and alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la, MW of 14,200 Da) content, which represents 50 and 20% of the total bovine whey proteins (WP), respectively (O'mahony & Fox 2013; Prazeres *et al.*, 2012). The intrinsic value of whey is now well recognized and it is mostly used for the production of WP isolates and concentrates, even if protein fractionation is preferable for producing pure individual protein fractions (Smithers 2015). These WP exhibit interesting functional and nutritional

properties due to their high essential amino acids contents (Jouan 2002). Moreover, WP represent an excellent source of bioactive peptides (antimicrobial, opioid, antihypertensive, antitumor, antiviral or cholesterol lowering activity)<sup>3</sup>. In addition, and specifically for  $\alpha$ -la, the presence of tryptophan is important for infant formula because of its role in synthesis of the neurotransmitter serotonin (Kamau *et al.*, 2010; O'mahony & Fox 2013; Toro-Sierra *et al.*, 2013). Purified  $\alpha$ -la from bovine milk is also widely used in infant supplements to replace  $\beta$ -lg, which has high allergenicity because of its absence in human milk (Bansal & Bhandari 2016; Kamau *et al.*, 2010; O'mahony & Fox 2013). Since  $\alpha$ -la is the main protein of human milk, the production of a purified  $\alpha$ -la fraction from bovine WP is of growing interest but remains challenging for food, nutraceutical and pharmaceutical industries (Smithers 2015). The main issue is that the currently available industrial technologies such as membrane filtration have limited effectiveness, especially in separating protein mixtures of similar molecular weight (Bansal & Bhandari 2016; Smithers 2015).

Several strategies and separation technologies have been studied for fractionating similar molecular weight proteins like  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg (Smithers 2015). For example, different fractionation methods, such as selective precipitation, adsorption and elution, and membrane filtration have been developed (Etzel 2004). However, the main drawbacks of existing technologies for fractionation of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg is the difficulty to scale-up, and yield and purity degrees are generally low (Bansal & Bhandari 2016; El-Sayed & Chase 2011). Moreover, these methods comprise several steps thus resulting in low productivity. Cheang and Zydney (2003, 2004) demonstrated that optimization of membrane filtration parameters such as use of successive molecular cut off values membranes could achieve 85-95% of yield at laboratory-scale (Cheang & Zydney 2003, 2004). More recently, purification and yield of 91.3-97.2% and 60.7-80.4%, respectively, of  $\alpha$ -la were obtained by selective thermal precipitation of  $\alpha$ -la combined with microfiltration and ultrafiltration (Toro-Sierra *et al.*, 2013). Fractionation of WP using a combination of tryptic hydrolysis and membrane filtration has also been studied. This protocol produced 90-95%  $\alpha$ -la purification and 15% yield (Konrad & Kleinschmidt 2008). Another study used supercritical carbon dioxide as a low-cost fractionation technology to purify WP isolates. The authors obtained 57% purification of  $\alpha$ -la and 71% yield (Yver, Bonnaille,

Yee, Mcaloon & Tomasula 2011). Currently, the separation of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg in whey is performed mainly using chromatographic processes such as ion exchange chromatography, high-performance liquid chromatography (HPLC) or gel permeation chromatography. However, these processes which require high volumes of environmentally toxic solvents and are time consuming and expensive (Gerberding & Byers 1998; Kamau *et al.*, 2010; Smithers 2015; Thömmes & Etzel 2007). Optimal separation of WP using mature, easily scalable, and environmentally friendly technologies remains difficult (Kamau *et al.*, 2010). Consequently, it is necessary to study and expand the application of emerging and innovative chemical-free technologies to improve the fractionation of these two proteins. Nowadays, non-thermal alternative technologies are being developed to improve productivity, quality, safety and value of food products, and reduce greenhouse gases emissions, energy and water consumption (Pereira & Vicente 2010). The increased availability of this system conducts to a major decrease of the equipment cost therefor of the processed products cost (Wang *et al.*, 2016).

In this context, high hydrostatic pressure (HHP) processing is being explored as an alternative for diverse applications with more than 350 industrial installations world-wide within last 25 years (Knoerzer 2016; Wang, Riedl, Somerville, Balasubramaniam & Schwartz 2011). The HPP consists of applying a uniform and instantaneous pressure to a liquid or solid matrix using a liquid pressure-transmitting medium, usually water (Pereira & Vicente 2010). As HHP is an eco-friendly technology and is considered to be one of the most promising emerging technologies in food industries (Jermann *et al.*, 2015), is a natural and eco-friendly process applicable to a wide range of food products with minimal loss of nutritional and organoleptic properties ("Global High Pressure Processing Market: Trends Analysis & Forecasts to 2021" 2016; Pereira & Vicente 2010). Developed in the 1990's in Japan as a preservation process (Boland *et al.*, 2014; Lerasle *et al.*, 2012; Yordanov & Angelova 2010), HHP technology was largely studied for its impact on milk proteins (Bravo *et al.*, 2015; Considine *et al.*, 2007a; Huppertz & De Kruif 2007; Huppertz, Fox, *et al.*, 2004a; Huppertz, Kelly & Fox 2004; Mazri *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2006; Rastogi, Raghavarao, Balasubramaniam, Niranjana & Knorr 2007; Smiddy, Martin, Kelly, De Kruif & Huppertz 2006). While the effect of HHP on modification of milk protein structures largely depends on the protein's physicochemical properties and pressurization parameters (pressure, time and temperature), it was demonstrated that HHP could modify the size of caseins

(CN) and caused the denaturation and aggregation of WP. More specifically,  $\beta$ -lg was demonstrated to be the most sensitive to HHP treatment, leading specific aggregation with other milk proteins, mainly with CN (Boland *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2015; Mazri *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2006). Therefore, modulating aggregation of CN and WP under HHP may be an innovative tool for protein fractionation. Thus, the aim of this work was to develop an alternative method for WP fractionation using HHP as a pre-treatment technology. The main objectives of this work were to optimize the HHP parameters (time and pressure) by 1) quantifying the yield and purity of obtained  $\alpha$ -la enriched-fractions obtain after subsequent acidification of pressure treated solution at the CN's isoelectric point; 2) to characterize WP aggregates generated by specific interactions with two different CN ligands under different pressurization conditions.

## **4.4 Materials and Method**

### **4.4.1 Materials**

Alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la) (batch# JE 022-4-410) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg) (batch# JE 001-1-922) powders were kindly provided by Agropur Ingredients (La Crosse, WI). According to the manufacturer, the total protein content of  $\alpha$ -la was  $97.3\% \pm 0.3$  and  $\beta$ -lg was  $97.0\% \pm 0.1$ . The  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg contents were  $92.5\% \pm 2.5$  and  $92\% \pm 3.0$ , respectively. In this study, two different caseins (CN), isoelectric (IC) and micellar (MC) were used as ligand to bind with WP and render  $\beta$ -lg insoluble under subsequent HHP treatment and acidification at the CN's isoelectric point (pH 4.6). Isoelectric casein (IC) (Lot# SLBM5975V) was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, USA) with a protein content of 86% to 96% according to the manufacturer. The MC was produced in our laboratory as described below.

### **4.4.2 Preparation of micellar casein**

Eighty liters of whole raw milk (Fromagerie Les Rivières- Quebec, Quebec, Canada) was received on the first day of processing and was immediately skimmed at 55°C with a semi-pilot scale creamer (Westfalia LWA205 - Centrico Inc. / San Francisco, California, USA). After

skimming, the milk was stored overnight at 4°C. On the second day, the skim milk was heated at 55°C and transferred into a uniform transmembrane pressure system (Tetra Alcross MSF 1, Tetra Pak, Lund, Denmark) equipped with 1.4- $\mu\text{m}$  nominal pore diameter ceramic membrane (Membralox - Pall Corp., East Hills, New-York, USA) (total area of 0.35 m<sup>2</sup>) to remove bacterial contamination. The debacterized skim milk was microfiltered on a 0.1- $\mu\text{m}$  ceramic tubular membrane (Membralox, Pall Corp., East Hills, New-York, USA) according to the protocol described by Hurt and Barbano (2010) (Hurt & Barbano 2010). The resulting MF retentate was successively concentrated and diafiltered to a volumetric concentration factor of 10.0 X. All filtration steps were performed at a transmembrane pressure from 0.1 to 0.5 bars. The CN-enriched retentate recovered after MF fractionation was finally freeze-dried and stored at room temperature sheltered from the light.

#### **4.4.3 Chemical analysis of protein powders**

The moisture content of the protein powders used (MC, IC,  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg) was determined according to AOAC 927.05 (for  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg) and IDF 78:2006 methods (for CN; IC and MC). The total nitrogen (AOAC 991.20), non-protein nitrogen (AOAC 930.29), and non-CN nitrogen (AOAC 998.06) contents were analyzed by the Kjeldhal method for both powders. The mineral (ash) content was obtained using method IDF 90:2008. Table 11 presents the exact compositions of MC, IC,  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg. In agreement with Pizzano, Manzo, Adalgisa Nicolai and Addeo (2012) and according to HPLC analysis, the nitrogen percentage detected in the pH 4.6 insoluble fraction for  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg powders (11.62% and 8.51%, respectively) correspond to denatured  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg proteins.

Table 11. Composition (% dry weight basis) of micellar casein (MC), isoelectric casein (IC), alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg) powders

	Protein Powders			
	MC	IC	$\alpha$ -la	$\beta$ -lg
Moisture (%)	1.14 $\pm$ 0.11	6.48 $\pm$ 0.12	6.49 $\pm$ 0.06	3.78 $\pm$ 0.07
Nitrogenous matter (%)	87.79 $\pm$ 0.40	80.60 $\pm$ 7.19	90.08 $\pm$ 3.49	94.21 $\pm$ 0.74
<i>pH 4.6 insoluble protein</i>	84.36	80.02	11.62	8.51
<i>pH 4.6 soluble protein</i>	2.67	0.17	78.46	85.25
<i>Non protein nitrogen</i>	0.76 $\pm$ 0.01	0.41 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.11	0.45 $\pm$ 0.03
Non nitrogenous matter (%)	12.21	19.40	9.92	5.79
<i>Minerals</i>	8.08 $\pm$ 0.03	1.16 $\pm$ 0.10	-	-
<i>Other (fat, carbohydrates, etc.)</i>	4.13	18.24	-	-

#### 4.4.4 Preparation of protein model solutions

Model solutions of milk protein were prepared to determine the impact of pressurization parameters on protein interaction and  $\alpha$ -la recovery. Thus, equal ratio (1:1:1) solutions of  $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg and CN powders with a final concentration of 0.75% were prepared by solubilizing the different powders in a Tris-HCl 0.2 M buffer at pH 6.6 (per liter: 24.22 g Tris, HCl added to pH 6.6).

#### 4.4.5 Experimental methodology

The methodology used for the fractionation of WP is illustrated in Figure 16. The protein model solutions described in the previous section were individually transferred into a flexible plastic bag for HHP treatments at 200, 400 and 600 MPa for 100, 200 and 300 s at room temperature in a discontinuous hydrostatic pressurization unit, the Hiperbaric 135 L (Hiperbaric - Burgos, Spain) with water as the pressure transmission medium. The stainless-steel pressure vessel measured 0.30 m in diameter and 2.20 m in length with a working volume of 135 L. After pressurization, the milk protein solutions were acidified with HCl to pH 4.6 and centrifuged at 8000 rpm for 25 min in a Sorvall GSA rotor (American Laboratory Trading, Inc. / East Lyme,



Connecticut, USA). The supernatants were collected for further analysis. Each treatment was performed in triplicate.

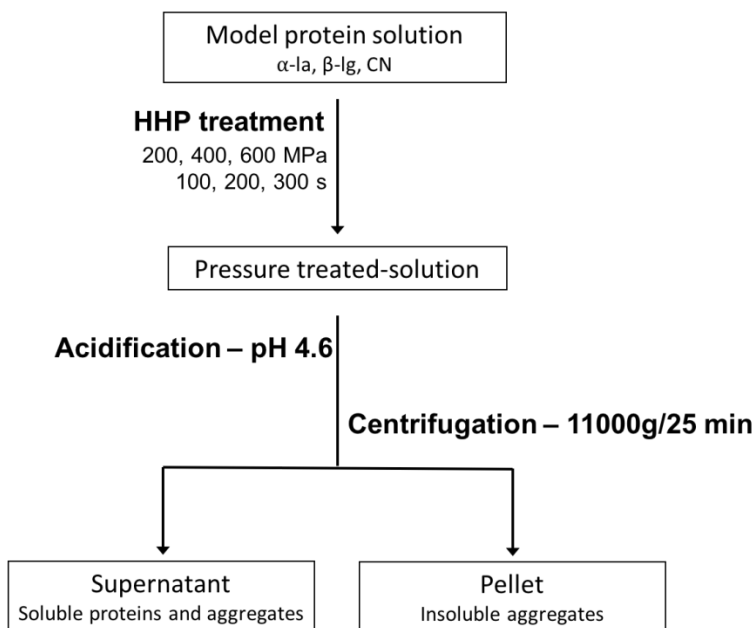


Figure 16. Schematic diagram representing the steps for the fractionation of  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) from milk proteins solution using HHP as a pre-treatment.

#### 4.4.6 Determination of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin concentrations in supernatants

Concentrations of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg in the supernatants after acidification of protein model solutions were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC; 1100 Series, Agilent Technologies - Palo Alto, California, USA). A Luna C18 column (250mm x 2mm) (Phenomenex, Torrance, California, USA) was used and operated at a flow rate of 0.2 mL/min at 40°C. The gradient was composed of solvent A (0.10% v/v trifluoroacetic acid (TFA)) and solvent B (90% acetonitrile; 10% v/v water, 0.10% v/v TFA). Samples (20  $\mu$ L) were injected and eluted with solvent B using a gradient of 3 to 55% over 85 min, 55 to 100% over 105 min, and 100 to 3% over 115 to 130 min. The detection wavelength was 214 nm, corresponding to the

typical protein bounds absorbance. To determine concentrations of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg in the supernatants, the area under the curve of each  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg peak detected on the HPLC chromatogram was compared to the area under the curve of a peak of standard solutions of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg at known concentrations.

#### 4.4.7 Calculation of protein recovery, alpha-lactalbumin purification degree and protein ratio

The protein recovery rates of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg were calculated and compared with controls according to the following equation:

$$\text{protein recovery} = \frac{C_{\text{treat}}}{C_{\text{con}}} \cdot 100 \quad (1)$$

where  $C_{\text{treat}}$  and  $C_{\text{con}}$  correspond to the concentration (expressed in mg/mL) of either  $\alpha$ -la or  $\beta$ -lg from the pH 4.6 soluble fraction in pressure-treated ( $C_{\text{treat}}$ ) and control ( $C_{\text{con}}$ ) solutions.

The purification degree of  $\alpha$ -la was calculated and compared with the control according to the following equation:

$$\alpha - \text{la purification degree} = \frac{C_{\alpha\text{-la}}}{C_{\alpha\text{-la}} + C_{\beta\text{-lg}}} \cdot 100 \quad (2)$$

where  $C_{\alpha\text{-la}}$  and  $C_{\beta\text{-lg}}$  correspond to the concentration (expressed in mg/mL) of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg in the pH 4.6 soluble fraction.

The protein ratio  $\alpha$ -la /  $\beta$ -lg was calculated and compared with the control according to the following equation:

$$\text{protein ratio} = \frac{R_{\alpha\text{-la}}}{R_{\beta\text{-lg}}} \quad (3)$$

where  $R_{\alpha\text{-la}}$  and  $R_{\beta\text{-lg}}$  correspond to the recovery of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg in the pH 4.6 soluble fraction and are expressed as a percentage. Protein recoveries were calculated according to equation (1).

#### **4.4.8 Composition of pressure-treated solutions**

Size exclusion chromatography (SEC) coupled to the HPLC system (1100 Series, Agilent Technologies - Palo Alto, California, USA) was used to fractionate and characterize the protein aggregates from pressurized solutions. The ENrich™ SEC 650 column (300mm x 7mm – separation range of 5 to 650 kDa) from Bio-rad (Hercules, California, USA) was used with an isocratic mobile phase composed of phosphate buffered saline (PBS, per liter: 8.0g NaCl, 0.2g KCl, 1.42g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) at pH 7.0. The injection volume was 100 μL, run at 0.75 mL/min for 35 min and the peaks were detected at 214 nm. The analysis of aggregates composition was performed in duplicate on pressurized solutions before acidification. Molecular sizes were then determined from retention time using a commercial gel filtration standard lyophilized mix of thyroglobulin (670,000 Da), bovine γ-globulin (158,000 Da), chicken ovalbumin (44,000 Da), equine myoglobin (17,000 Da), and vitamin B12 (1,350 Da) from Bio-rad (Hercules, California, USA).

All fractions obtained by HPSEC were collected and dried using a Savant™ SpeedVac™ concentrator (SPD131DDA) connected to a refrigerated vapor trap (RVT400) and a vacuum pump (OFP400) from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). After resolubilization into 5 μL of deionized water, fractions were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under reducing conditions.

#### **4.4.9 Determination of milk protein profiles and composition of aggregates**

Mono-dimensional PAGE was performed on pressurized-solutions as well as supernatants recovered after acidification to pH 4.6 to determine the milk protein profiles after HHP treatment. Reduced PAGE was carried out on pressurized-solutions, supernatants and fractions recovered from HPSEC to analyze the composition of protein aggregates. Five microliters of each sample (supernatants, pressurized solutions and HPSEC fractions) was diluted in 15 μL of deionized water and 20 μL of the sample buffer was added for reducing electrophoresis (reduced sample buffer: 5% 2-mercaptoethanol, 95% Laemmli buffer) and native (native sample buffer:

62.5 mM Tris-HCl, 40% glycerol, 0.01% bromophenol blue) electrophoresis. Bio-rad mini-protean TGX precast gels containing 12% acrylamide (Bio-rad - Hercules, California, USA) were used and electrophoresis was carried out under reducing and native conditions. Ten microliters of each sample and 6  $\mu$ L of a molecular weight control (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, Bio-rad) were loaded. Native electrophoresis was stopped after a 75 min migration in the running buffer (20% methanol, 10% Tris-glycine buffer, 70% deionized water). Meanwhile reducing electrophoresis was stopped after a 50 min migration in the running buffer (10 % Tris-glycine SDS buffer, 90% deionized water). Native-PAGE does not provide information on the molecular weight because of the absence of SDS in the running buffer. Consequently, proteins migrate according to their molecular size and overall charge. Thus, proteins were identified from controls on either side of the samples. Gels were then stained with Coomassie Brilliant Blue for 60 min and destained overnight in a 10% methanol, 10% acetic acid and 80% deionized water solution. Finally, destained gels were photographed using Gel Doc™ XR from Bio-rad.

#### **4.4.10 Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using Statistical Analysis System (SAS) University Edition, SAS® Studio 3.5 software. For the first part of the study, which determined optimal pressurized parameters, a randomized complete block design with 10 treatments (different time and level of pressure) in multiple blocks ( $n \geq 3$ ) was used. For each experiment, the experimental unit was a sample which received one treatment. Tukey tests ( $\alpha = 0.05$ ) were used as multiple comparison tests.

## **4.5 Results**

### **4.5.1 Relationship between pressure-time and protein denaturation/aggregation**

Figure 17 A and B shows the native and reduced PAGE profiles of control and pressure-treated milk protein solutions. Since protein profiles were similar whatever the CN (IC or MC) used, only samples treated with MC are described. Native PAGE of milk protein solutions (Fig. 17 A)

showed that large aggregates were observed in the loading well ( $X_1$ ) for the CN standard as well as pressurized samples. However, some differences in band intensities were observed between pressure-treated and control samples. The intensity of bands corresponding to  $\beta$ -lg decreased as a function of the level of pressurization applied, especially at 600 MPa, and pressurization time did not seem to affect  $\beta$ -lg concentration. Moreover, the presence of larger aggregates ( $X_2$ ), mostly observed at 600 MPa (for any pressurization time) was inversely related to bands of native  $\beta$ -lg. Contrary to the  $\beta$ -lg,  $\alpha$ -la concentration remained constant in all pressure-treated samples. Under reducing conditions (Fig. 17 B), protein profiles were similar for control and pressure-treated samples. No change in band intensity corresponding to  $\beta$ -lg,  $\alpha$ -la or CN was observed.

Figure 17 C and D shows the native and reduced PAGE of supernatants recovered after acidification of control and pressure-treated protein model solutions at pH 4.6. As expected, no bands corresponding to CN were identified in the pH 4.6-soluble fractions (Fig. 17 C and D) since the milk protein solutions were acidified to the CN isoelectric point. As observed for Figure 17 A,  $\beta$ -lg band intensities decreased as a function of pressure while no loss of  $\alpha$ -la occurred, whatever the pressure-time conditions applied, except for the 300 s 600 MPa treatment (Fig. 17 C and D). Moreover, compared to the profile of pressure-treated milk protein solutions (Fig. 17 A), only a small amount of protein aggregation was observed in the pH 4.6-soluble fractions (Fig. 17 C).

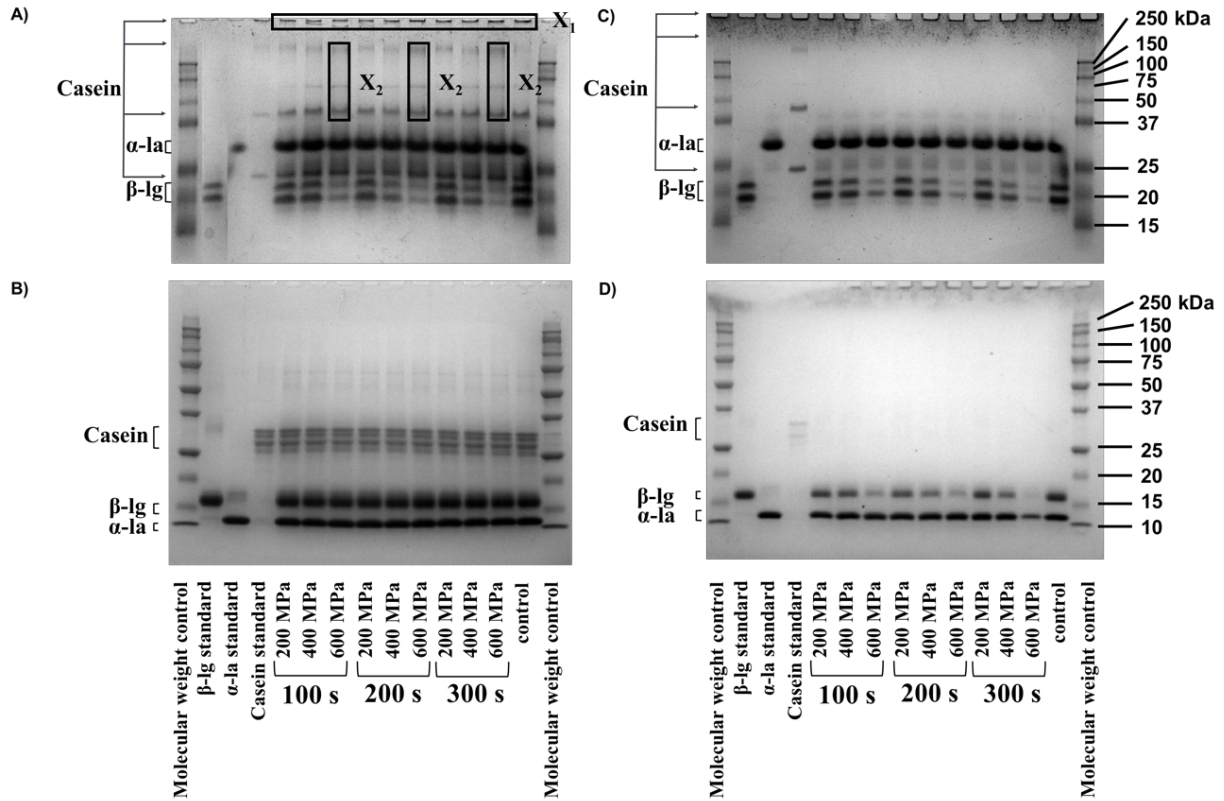


Figure 17. Native (A) and reduced (B) PAGE of pressure-treated milk protein solutions using micellar casein (MC) as ligand. Native (C) and reduced (D) PAGE of pH 4.6-soluble fractions (supernatants) recovered after acidification at pH 4.6 of pressure-treated milk protein solutions when MC was used as ligand.

#### 4.5.2 Impact of pressurization and acidification on whey protein using 3D plots

To confirm the results observed by PAGE, a 3D plots was performed to determine the impact of pressure-time conditions on the recovery of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg in the pH 4.6-soluble fractions when MC (Fig. 18 A) and IC (Fig. 18 B) ligands were used. The type of CN ligand had a significant impact ( $p < 0.05$ ) on  $\alpha$ -la recovery. Using IC, the average recovery of  $\alpha$ -la was 87% in the supernatant while recovery of milk protein solutions containing MC reached 95% after pressurization. Three dimensional plots show a higher  $\alpha$ -la recoveries for both types of CN at about 350 MPa. Meanwhile, the  $\alpha$ -la recoveries were the least at 600 MPa with 83 and 78% for

MC and IC, respectively, and was significantly different from other treatments ( $p < 0.0001$ ). Contrary to  $\alpha$ -la, important changes in  $\beta$ -lg fraction recovery were observed after pressurization and acidification of milk protein solutions (Fig. 18).  $\beta$ -lactoglobulin content decreased drastically as a function of the pressure-time conditions, whatever the type of CN used, and this tendency was significantly different ( $p < 0.0001$ ) between both types of CN. For all pressure-time treatments, the use of MC resulted in a lower decrease in  $\beta$ -lg recovery from the supernatant: just 41% compared to 53% using IC. More specifically, a pressurization treatment of 100 s induced decreases of 60% and 66% in  $\beta$ -lg recovery from 200 MPa to 600 MPa for MC and IC, respectively, while  $\beta$ -lg losses of 81% and 86% were calculated after 300 s of HHP treatment. Statistical analysis showed that the interaction between time and pressure had a significant impact on the decrease in  $\beta$ -lg recovery to 80.58% (MC – Fig. 18 A) and 85.90% (IC – Fig. 18 B) from 100 s and 200 MPa to 300 s and 600 MPa.

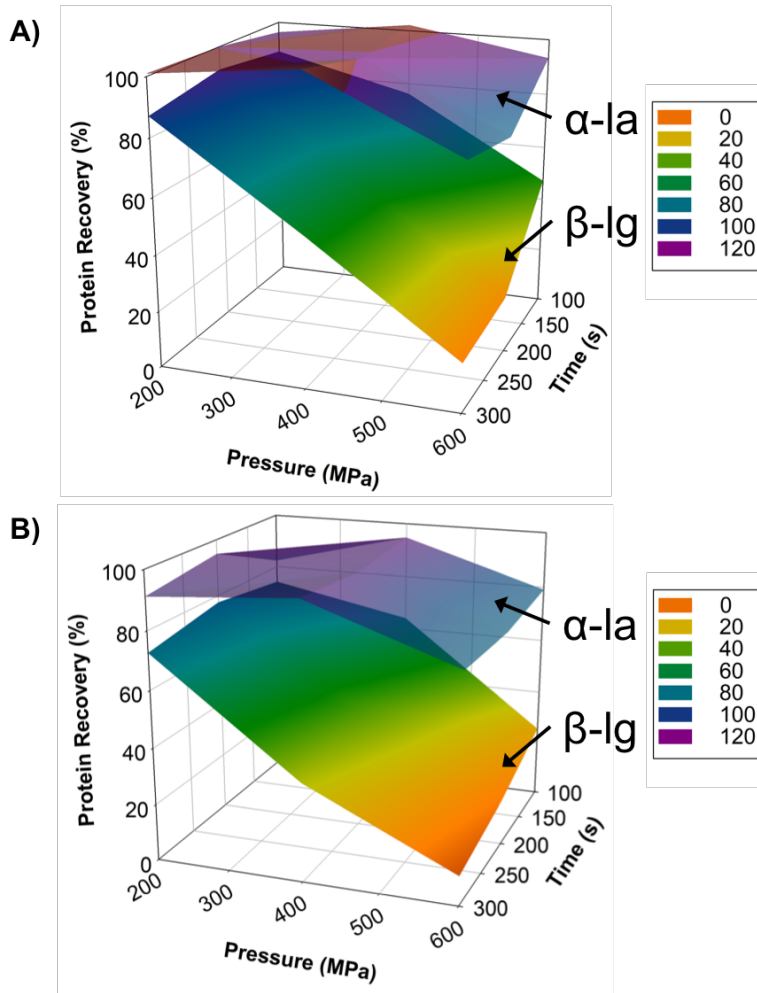


Figure 18. Surface response of the recovery of  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) in pH 4.6 soluble fraction in function of the time and the pressure for MC (A) and IC (B). The colour scale at right represents the mean values of multiple replicates ( $n>3$ ) of protein recovery (%).

Figure 19 shows more precisely the  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la recovery as a function of pressure-time relationship and type of CN (MC, Fig. 19 A and IC, Fig. 19 B) compared to the control (unpressurized). The data shown in Figure 19 confirms that the effect of pressure on  $\alpha$ -la recovery is also observed throughout the mean comparison of all MC-treatments with controls ( $p<0.01$ ), where 600 MPa at 200 s and 300 s conditions are significantly different from others. Conversely, no significant difference was observed for the mean comparison of all IC treatments



with controls (unpressurized) (Fig. 19 B). Compared to the control solution, the recovery of  $\beta$ -lg decreased as the pressure and time increased. More than 5 and 7 times of  $\beta$ -lg recovery were lost when the pressure and time (severity of treatment) were increased from 200 to 600 MPa and 100 to 300 s using MC and IC, respectively. The 600 MPa treatments were the most effective, taking into account both  $\alpha$ -la recovery and  $\beta$ -lg loss regardless of time. Though no significant effects were noticed between treatments at 600 MPa a declining trend with the increase in time was noticed for both types of CN. However, the choice of CN had a considerable impact as MC and IC resulted in decrease of the recovery of  $\beta$ -lg by 18 and 10%, respectively.

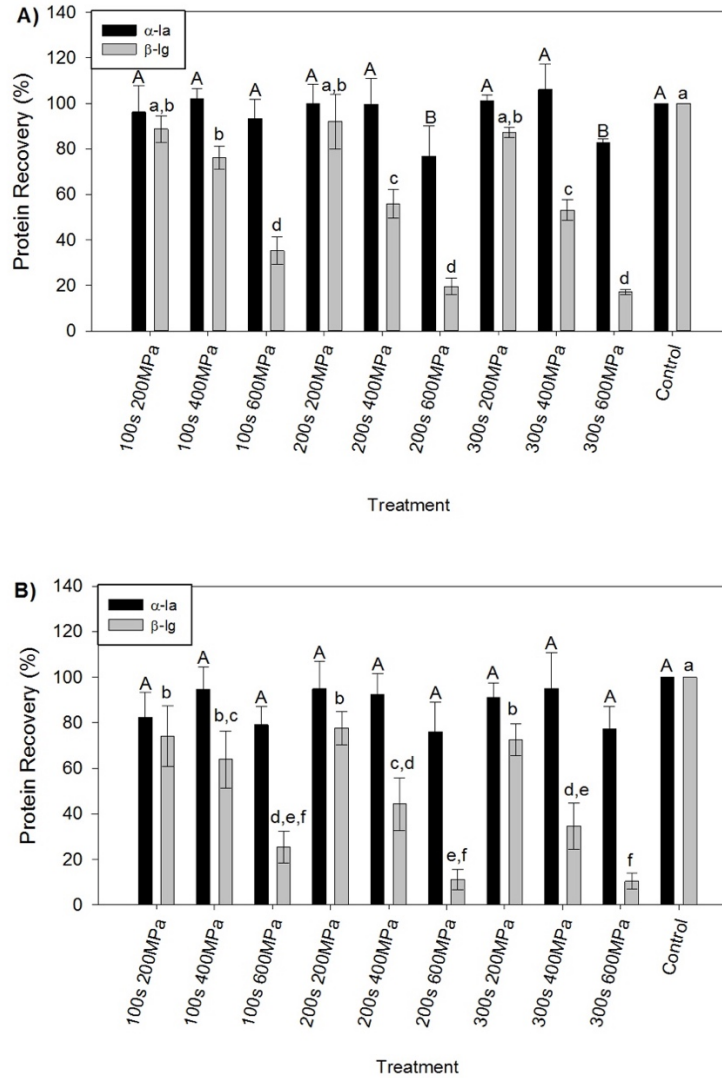


Figure 19. Effect of the level of pressure and time on the recovery of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg remaining in the supernatant using MC (A) and IC (B), after an acidification at pH 4.6. Bars show the standard deviation of mean values of multiple replicates ( $n > 3$ ). Each comparison has been made by protein ( $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg) (Tukey test;  $\alpha = 0.05$ ). Mean values with different letters are significantly different.

#### 4.5.3 Alpha-lactalbumin purification degree and final protein ratio

Figure 20 shows the purification degree of  $\alpha$ -la, calculated using equation (1), as a function of pressurization treatments for both types of CN. Statistical analysis indicated that CN used in

protein model solutions had no impact on  $\alpha$ -la purification degree. However, pressure/time combinations had a significant effect on the purity of the  $\alpha$ -la fraction, specifically at 400 MPa ( $p=0.0002$ ) and 600 MPa ( $p<0.0001$ ). In addition, the purification degrees at 600 MPa were similar at 200 and 300 s. The final ratios of  $\alpha$ -la: $\beta$ -lg in pH 4.6 soluble fractions were calculated using equation (3), and are expressed as a function of HHP treatments for both types of CN (Table 12). As observed for the  $\alpha$ -la purification degree, the type of CN had no significant impact on the final ratio (P values not shown in Table 12). However, treatments at 300s and 600 MPa produced a protein ratio considerably higher as compared to other. The final protein ratios for MC or IC as a ligand were found to be respectively (Table 12). From the results, the best pressurization condition was determined to be 600 MPa and 300 s with IC as ligand, which produced the highest purity of  $\alpha$ -la and protein ratio, 86% and 7.4, respectively.

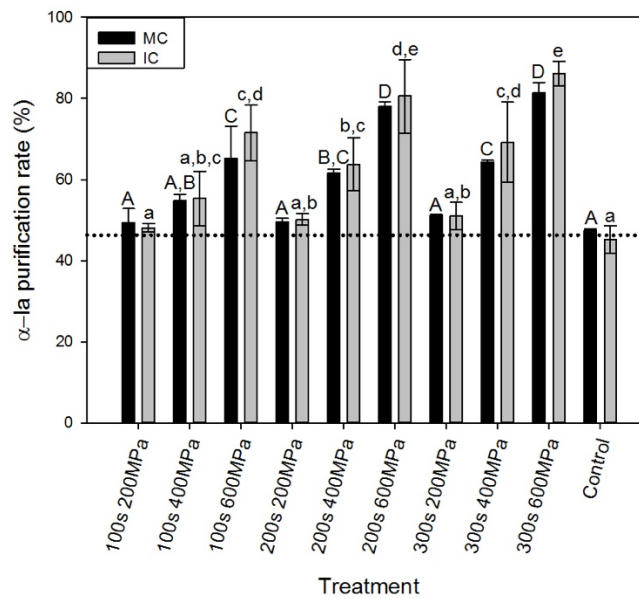


Figure 20. Effects of the level of pressure and time and the type of casein on the  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) purification rate. Mean values of purification rates are based on multiple replicates ( $n>3$ ). Each comparison has been made by type of casein (IC and MC) (Tukey test;  $\alpha = 0.05$ ). Mean values with different letters are significantly different.

Table 12. Protein ratios in the pH 4.6 soluble fraction, calculated according to equation (3). The mean protein ratio values are based on multiple replicates ( $n > 3$ ). Each comparison has been made by treatment (Tukey test;  $\alpha = 0.05$ ). Mean values with different letters are significantly different.

Treatment	Protein Ratio	
	MC	IC
Control	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
100 s 200 MPa	1.09 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.12 <sup>a</sup>
100 s 400 MPa	1.34 ± 0.06 <sup>a, b</sup>	1.48 ± 0.25 <sup>a, b</sup>
100 s 600 MPa	2.18 ± 0.69 <sup>c</sup>	3.10 ± 0.80 <sup>b, c</sup>
200 s 200 MPa	1.09 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.11 <sup>a</sup>
200 s 400 MPa	1.78 ± 0.04 <sup>b, c</sup>	2.09 ± 0.77 <sup>a, b</sup>
200 s 600 MPa	3.93 ± 0.22 <sup>d</sup>	4.71 ± 2.90 <sup>c</sup>
300 s 200 MPa	1.19 ± 0.03 <sup>a, b</sup>	1.26 ± 0.12 <sup>a</sup>
300 s 400 MPa	2.00 ± 0.05 <sup>c</sup>	2.74 ± 1.56 <sup>a, b</sup>
300 s 600 MPa	4.90 ± 0.85 <sup>e</sup>	7.41 ± 1.90 <sup>d</sup>

#### 4.5.4 Analysis of aggregates in pressurized solutions

The composition of aggregates generated during pressurization of protein model solutions was studied with IC used as ligand since this condition produced the highest  $\alpha$ -la purification degree. The HPSEC profile of optimal pressure-treated milk protein solutions ( $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg and IC) at 600 MPa for 300 s is shown in Figure 21 A. Five fractions with different molecular sizes represented by the peaks (A to E) corresponding to different native or aggregate proteins were detected (Fig. 21 A). Molecular weights were determined as described in Materials and Methods. Each fraction, A > 650,000 Da, B  $\approx$  76,000 Da, C  $\approx$  44,000 Da, D  $\approx$  26,600 Da and E  $\approx$  16,000 Da, was collected and analyzed by PAGE under reducing conditions to obtain its precise composition (Fig. 21 B). As seen in Figure 21, the aggregate with the highest molecular weight (> 650,000 Da) (Fraction A) was mainly composed of  $\beta$ -lg. The CN standard showed that Fraction A was also composed of  $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN and a small amount of  $\beta$ -CN. The  $\beta$ -lg was also detected in aggregates with  $\alpha_{s2}$ -CN (Fractions B  $\approx$  76,000 Da and C  $\approx$  44,000 Da) and  $\alpha_{s1}$ -CN (Fraction B) and  $\beta$ -CN (Fraction B). Furthermore, lower molecular weight fractions such as D and E corresponded to monomeric  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la, respectively. Moreover, the intensity of  $\alpha$ -la bands was very low in fractions A, B and C. Acidification of milk protein solutions to pH 4.6 precipitated all fractions

composed of CN (Fractions A, B, and C) but allowed fractions D and E to remain in the supernatants as they did not precipitate at this pH. These results agree with those observed in previous sections, showing that the 600 MPa-300 s treatment was the best condition for recovery of  $\alpha$ -la after acidification of milk protein solutions.

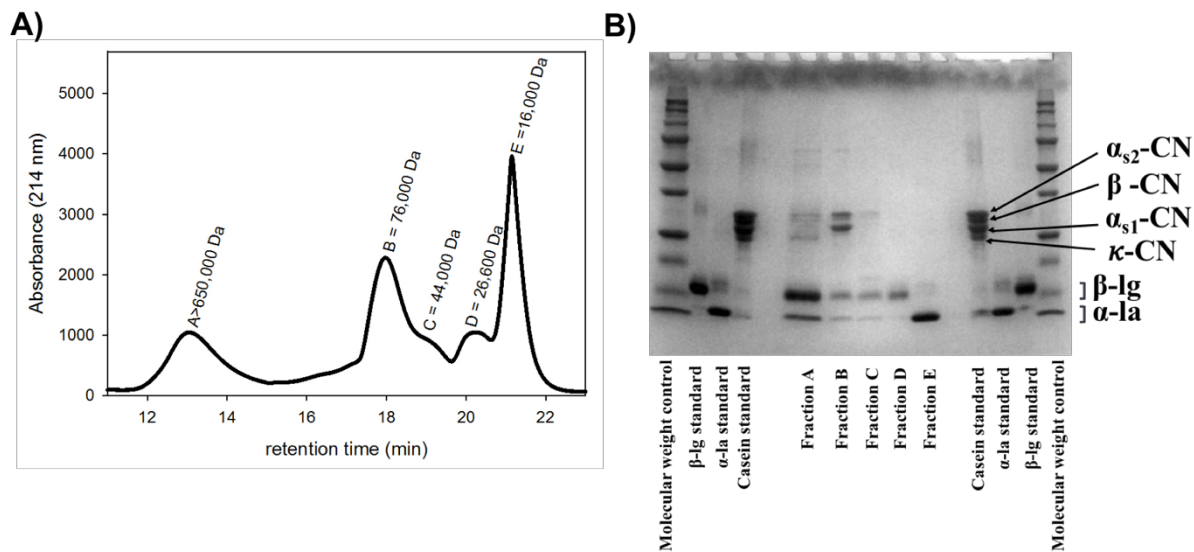


Figure 21. (A) HPSEC protein profile of pressure-treated milk protein solutions ( $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg and IC) at 300 s 600 MPa using isoelectric casein (IC) as ligand and (B) protein profile under the reduced conditions of fractions recovered from HPSEC analysis (B).

#### 4.6 Discussion

This work provides extensive knowledge on WP interactions between the WP or with CN after pressurization. The present research study gives an insight on how HPP could be used as a green pre-treatment method for the purification of  $\alpha$ -la from other WP by modulating milk protein interactions. The level of pressure, time and type of CN influenced the purification degree of  $\alpha$ -la considerably increased with the increase in pressure.

#### 4.6.1 Effect of HHP on whey proteins

The differences in sensitivity between the WP under HHP treatment at different times and pressures agree with the results previously obtained on complex solutions (Bravo *et al.*, 2013; Huppertz, Fox, *et al.*, 2004a, 2004b; Patel *et al.*, 2006). The higher number of disulfide bonds present in the  $\alpha$ -la structure (4) compared to  $\beta$ -lg (2) is responsible for greater rigidity and, therefore, increased stability of the  $\alpha$ -la protein. Consequently, a higher recovery rate was obtained for  $\alpha$ -la in the supernatant after precipitation at pH 4.6 (Figs. 18 and 19) (Gaucheron *et al.*, 1997). It has been noticed that no aggregation of pure  $\alpha$ -la occurred after HHP treatment until reaching 800 MPa (Patel *et al.*, 2006). However, some aggregates of  $\alpha$ -la were noticed when the protein was in a mixture with  $\beta$ -lg which contains a free reducing thiol (S-H) group (Boland *et al.*, 2014; Grinberg & Haertlé 2000; Jegouic, Grinberg, Guingant & Haertle 1997; Patel *et al.*, 2006). Thus, the slight loss of  $\alpha$ -la observed in this work at 600 MPa for all conditions of time, was probably explained by the presence of the  $\beta$ -lg thiol groups which generated large heterogeneous oligomers of  $\alpha$ -la (Figs. 19 A and B).

#### 4.6.2 Interactions between WP and CN under HHP treatment

The interactions generated between  $\beta$ -lg and CN under HHP depended on pressure values and pressurization durations which agreed well with the literature (Boland *et al.*, 2014). As mentioned by several authors,  $\beta$ -lg, the milk protein most sensitive to HHP, loses its native conformation and forms aggregates with other milk proteins (Boland *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2013; Huppertz, Fox, *et al.*, 2004b; Patel *et al.*, 2006) as observed in this work, particularly at 600 MPa for all treatment times ( $X_2$ ) (Fig. 17 A). The loss of  $\beta$ -lg in native PAGE from the pH 4.6-soluble fraction (Fig. 17 C) could be due to its auto-aggregation as non-soluble aggregates and its interaction with CN, forming large disulfide-bonded aggregates (Huppertz, Fox, *et al.*, 2004a). These results agree with those of Patel *et al.*, (2006), and Huppertz, Fox, *et al.*, (2004a). The denaturation of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg under HHP treatment mainly occurs through the sulfhydryl-disulfide interchange reaction. As  $\beta$ -lg native band intensities decrease in comparison with the control, pressure treatment induces a decrease in the level of pH 4.6-soluble  $\beta$ -lg fractions (Fig. 17 B and D). It suggests that the  $\beta$ -lg is present as larger aggregates either in the loading well

(with CN) (Fig. 17 A – X<sub>1</sub>) or within aggregates observed on the gel (with CN and/or  $\beta$ -lg) (Fig. 17 A – X<sub>2</sub>). It has already been observed that pressurization of milk induced modification of whey protein solubility, specifically decrease the solubility of  $\beta$ -lg soluble which was detected in the non-soluble fraction (Bravo *et al.*, 2013, 2015; Huppertz, Fox, *et al.*, 2004a). Thus, the decrease in the recovery of  $\beta$ -lg confirms that the protein was involved in different forms of aggregates at lower pressures (200 and 400 MPa) than  $\alpha$ -la (Fig. 18). However, at 600 MPa,  $\alpha$ -la was also present in the aggregates, resulting in a slight but non-significant loss of recovery rate (Fig. 18). These results agreed with those observed using PAGE (Fig. 17). The most important effect of HHP on protein denaturation was observed at 600 MPa which is in agreement with the previous observation on the sensitivity of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg to HHP treatment starting from 150 and 400 MPa, respectively (Boland *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2013, 2015; Considine *et al.*, 2007a; Mazri *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2006).

#### 4.6.3 Type of interactions induced by pressurization

According to CN physicochemical properties, analysis of aggregation profiles under HHP treatment (Fig. 21) shows two distinct aggregates: (1)  $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN, and a large portion of  $\beta$ -lg mainly linked by the disulfide bonds corresponding to fraction A, and (2)  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN and a small amount of  $\beta$ -lg, supposedly linked by hydrophobic interactions associated to fractions B and C. A small amount of  $\alpha$ -la was also detected in fractions A and B due to the interaction with  $\beta$ -lg, as mentioned earlier. As demonstrated by several authors, the presence of two-cysteine residues in  $\kappa$ -CN and  $\alpha_{s2}$ -CN could induce interactions and aggregation of these CNs with the thiol-free group in  $\beta$ -lg and with  $\alpha$ -la through sulfhydryl-disulfide interchange reaction (Funtenberger, Dumay & Cheftel 1997b; Huppertz, Fox, *et al.*, 2004a, 2004b; Jegouic *et al.*, 1997). Indeed,  $\beta$ -lg can only be linked by disulfide bonds with  $\kappa$ -CN and  $\alpha_{s2}$ -CN (Boland *et al.*, 2014; Considine *et al.*, 2007a; Huppertz, Fox, *et al.*, 2004b; Patel *et al.*, 2006) which supports that fraction A (Fig. 21 A and B) was largely composed of  $\beta$ -lg. Moreover, the two  $\alpha$ -CN are highly hydrophobic and could potentially interact with the hydrophobic core of  $\beta$ -lg, resulting in potentially hydrophobic aggregates (fractions B and C) (Boland *et al.*, 2014; Considine *et al.*, 2007a; Considine, Patel, Anema, Singh & Creamer 2007b; Patel *et al.*, 2006).

Moreover, at 600 MPa,  $\beta$ -lg has been reported to be involved in hydrophobic and disulfide-linked aggregates (Boland *et al.*, 2014; Considine *et al.*, 2007a; Considine *et al.*, 2007b; Patel *et al.*, 2006) which justifies its presence in both types of aggregates.

#### 4.6.4 Protein recoveries and purification degrees

In this study, the different interactions generated between  $\alpha$ -la/ $\beta$ -lg and CN can be explained by the differences in structure of each CN (IC or MC). Isoelectric casein was produced by isoelectric precipitation which induced complete dissociation of the micelle, while MC's tertiary and quaternary structures were preserved. Furthermore, pressure treatment of milk containing CN similar to MC above 250 MPa disrupted the micelle and reduced its size by solubilizing the micellar calcium phosphate (Bravo *et al.*, 2015; Harte *et al.*, 2007; Huppertz & De Kruif 2006; Huppertz & De Kruif 2007; Huppertz, Fox, *et al.*, 2004a; Huppertz, Kelly & De Kruif 2006). Even though no significant differences in the  $\alpha$ -la purification degree are observed between MC and IC, the choice of IC over MC is justified due to its higher commercial availability and lower cost. Moreover, differences observed in terms of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg recoveries were due to the protein structure modifications under pressurization related to their barosensitivity. Consequently, recovery has a direct impact on purification degrees and final protein ratio since these last calculations were based on the recovery values.

Treatments at 600 MPa for 30 min on complex solutions such as whey, milk or mixtures (25, 50 or 100% milk/whey) reported by Huppertz *et al.*, (2004a and b) were similar to results obtained here using MC as a ligand at 600 MPa for 300 s, in terms of the amount of denatured WP (Huppertz, Fox, *et al.*, 2004a, 2004b). It was demonstrated that an increase of pressurization time from 300 s to 30 min had minimal impact on the denaturation of both  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la. Indeed, the authors calculated 83% (average of value with 25, 50 and 100% milk/whey) of denatured  $\beta$ -lg (against 82.77% during 300 s at 600 MPa using MC).



Overall, this method achieves an  $\alpha$ -la purification degree of 86% with 77% protein recovery using IC, which is approximately the purity obtained by conventional methods such as membrane-filtration or chromatography but with a higher  $\alpha$ -la recovery (e.g., 15% of  $\alpha$ -la recovery by using ultrafiltration and tryptic treatment, 48% by using affinity chromatography or 36% by using ion-exchange chromatography)(El-Sayed & Chase 2011).

#### **4.6.5 Benefits, technological challenges and industrial feasibility of HHP**

As described previously, the fractionation of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg has been studied widely but remains challenging in terms of purity and productivity of final product as well as technological viability in industrial process (Etzel 2004). Some of the recently proposed methods such as sequential membrane fractionation (Cheang & Zydney 2004) and thermal precipitation coupled with membrane filtration (Konrad & Kleinschmidt 2008) have shown to achieve a purification degree similar to the present study. However, these techniques use fairly longer time and required numerous steps as compared to the strategy proposed in this work which is based on HHP treatment and a simple acidification and centrifugation. Furthermore, the conventional technologies for  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg fractionation are cost intensive mainly due to the maintenance (e.g. frequent membrane replacement) and cleaning requirements. Indeed, cleaning process by itself represents as much as 80% of the total production cost and generates a huge amount of chemical and wastewater effluents (Smithers 2015). In contrast, HHP, even though is a batch process, requires a shorter treatment time and minimizes environmental impacts associated with chemical cleaning agents (Wang *et al.*, 2016). Furthermore, several strategies have been set up to minimize the operating cost associated to the energy consumption during HHP treatment. Indeed, to offset the loss of energy during decompression, some HHP units are composed of a twin-vessel, where 50% of the energy could be recovered from the decompression of one vessel for the compression of the other (Pereira & Vicente 2010; Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2015). Also, vessel filling is a major player in terms of energy required per food product unit (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2015). The HHP operating cost represents a small portion, 20 to 25% of the total cost. According to Balasubramaniam *et al.*, (2016), the processing cost is about 0.117 €/kg of treated product for the same HHP system (Hiperbaric 135L) used in the present study for 3 min

at 600 MPa. The present work is undoubtedly a stepping-stone to diversify the application of HHP process as an alternative pre-treatment method in improving protein fractionation. Meanwhile, before the industrial application, it is crucial to demonstrate the efficacy of HHP on the fractionation of proteins from whey solutions having different physicochemical properties mainly in terms of composition and concentration of proteins.

#### **4.7 Conclusion**

Our results demonstrate that HHP pre-treatment of protein model solution led to the self-aggregation of  $\beta$ -lg as well as with CN whereas  $\alpha$ -la remains unaffected. Consequently, the acidification of pressure-treated solutions induced precipitation of almost all the  $\beta$ -lg and a very low amount of  $\alpha$ -la. which remains in solution. Increasing both pressurization level and time constantly increased the amount of  $\beta$ -lg in these aggregates. The acidification of pressure-treated solutions induced precipitation of almost all the  $\beta$ -lg and a very low amount of  $\alpha$ -la. The use of IC as ligand considerably decreased the amount of  $\beta$ -lg while maintaining the amount of  $\alpha$ -la. Indeed,  $\alpha$ -la purification degrees ranging from 81 to 86% with protein recoveries of 77 to 83% were achieved using the most severe HHP treatment (600 MPa – 300 s), which is competitive to other studies in terms of fractionation of  $\alpha$ -la. However, our process is based on a green technology which widely decrease the environmental impact of the fractionation in comparison with other technology such as chromatography. Overall, final protein ratios from 4.90 to 7.41 were achieved using a combination of HHP treatment and isoelectric precipitation. Consequently, this study clearly demonstrates that HHP pre-treatment of whey protein could be an efficient alternative approach to generate  $\alpha$ -la enriched-fraction. Further investigation is necessary to optimize the concentration of CN ligand to apply this methodology to real solutions with a lower  $\alpha$ -la/ $\beta$ -lg ratio as in case of acid and classical whey.

#### **4.8 Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## 4.9 Acknowledgements

The authors thank Ms. Diane Gagnon, Mélanie Martineau and Pascal Lavoie (Food Science Department, Laval University) for their technical support. We acknowledge Agropur Ingredients (La Crosse, WI) for providing whey protein ingredients and gratefully recognize the financial support of the The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

## 4.10 References

Bansal, & Bhandari. (2016). Functional Milk Proteins: Production and Utilization—Whey-Based Ingredients. In Mcsweeney & O'mahony (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects* (pp. 67-98). New York, NY: Springer New York.

Boland, Singh, & Thompson. (2014). *Milk Proteins: From Expression to Food* (2 ed.): Elsevier Science.

Bravo, Felipe, Lopez-Fandino, & Molina. (2013). High-pressure treatment of milk in industrial and pilot-scale equipments: effect of the treatment conditions on the protein distribution in different milk fractions. *European Food Research and Technology*, 236(3), 499-506.

Bravo, Felipe, Lopez-Fandino, & Molina. (2015). Skim Milk Protein Distribution As A Result Of Very High Hydrostatic Pressure. *Food Research International*, 72, 74-79.

Cheang, & Zydney. (2003). Separation of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin using membrane ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 201-209.

Cheang, & Zydney. (2004). A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *Journal of Membrane Science*, 231, 159-167.

Considine, Patel, Anema, Singh, & Creamer. (2007a). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments : A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 1-23.

Considine, Patel, Anema, Singh, & Creamer. (2007b). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments—a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 1-23.

El-Sayed, & Chase. (2011). Trends in whey protein fractionation. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1501-1511.

Etzel. (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 996S-1002S.

Funtenerger, Dumay, & Cheftel. (1997). High pressure promotes  $\beta$ -lactoglobulin aggregation through SH/SS interchange reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 912-921.

Gaucheron, Famelart, Mariette, Raulot, Michela, & Le Graeta. (1997). Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chemistry*, 59(3), 439-447.

Gerberding, & Byers. (1998). Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *Journal of Chromatography A*, 808(1), 141-151.

Global High Pressure Processing Market: Trends Analysis & Forecasts to 2021. (2016). Cision PRNewswire.

Grinberg, & Haertlé. (2000). Reducer driven baric denaturation and oligomerisation of whey proteins. *Journal of biotechnology*, 79(3), 205-209.

Harte, Gurram, Luedecke, Swanson, & Barbosa-Cañovas. (2007). Effect of high hydrostatic pressure and whey proteins on the disruption of casein micelle isolates. *Journal of Dairy Research*, 74(04), 452-458.

Huppertz, & De Kruif. (2006). Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure: influence of milk serum composition and casein micelle concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5903-5909.

Huppertz, & De Kruif. (2007). Disruption and reassociation of casein micelles during high pressure treatment: influence of whey proteins. *The Journal of dairy research*, 74(2), 194-197.

Huppertz, Fox, & Kelly. (2004a). High pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *The Journal of dairy research*, 71(1), 97-106.

Huppertz, Fox, & Kelly. (2004b). High pressure-induced denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research*, 71(04), 489-495.

Huppertz, Kelly, & De Kruif. (2006). Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure. *Journal of Dairy Research*, 73(03), 294-298.

Huppertz, Kelly, & Fox. (2004). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, 12, 561-572.

Hurt, & Barbano. (2010). Processing factors that influence casein and serum protein separation by microfiltration. *Journal of dairy science*, 93(10), 4928-4941.

Jegoic, Grinberg, Guingant, & Haertle. (1997). Baric oligomerization in alpha-lactalbumin/beta-lactoglobulin mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 19-22.

Jermann, Koutchma, Margas, Leadley, & Ros-Polski. (2015). Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 14-27.

Jouan. (2002). *Lactoprotéines et lactopeptides: Propriétés biologiques: Quae*.

Kamau, Cheison, Chen, Liu, & Lu. (2010). Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 197-212.

Knoerzer. (2016). *Nonthermal and Innovative Food Processing Technologies*. In Reference Module in Food Science: Elsevier.

Konrad, & Kleinschmidt. (2008). A new method for isolation of native  $\alpha$ -lactalbumin from sweet whey. *International Dairy Journal*, 18(1), 47-54.

Lerasle, Durantou, Simonin, Membré, Chéret, De Lamballerie, Guillou, & Federighi. (2012). Traitements par hautes pressions hydrostatiques des denrées alimentaires: état de l'art. *Revue Méd. Vét*, 163(12), 595-614.

Mazri, Sanchez, Ramos, Calvo, & Perez. (2012). Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. *European Food Research and Technology*, 234(5), 813-819.

O'mahony, & Fox. (2013). Milk proteins: Introduction and historical aspects. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 43-85): Springer.

Patel, Singh, Anema, & Creamer. (2006). Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3409-3420.

Pereira, & Vicente. (2010). Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, 43(7), 1936-1943.

Pizzano, Manzo, Adalgisa Nicolai, & Addeo. (2012). Occurrence of major whey proteins in the pH 4.6 insoluble protein fraction from UHT-treated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 8044-8050.

Prazeres, Carvalho, & Rivas. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.

Rastogi, Raghavarao, Balasubramaniam, Niranjana, & Knorr. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69-112.

Rodriguez-Gonzales, Buckow, Koutchma, & Balasubramaniam. (2015). Energy requirements for alternative food processing technologies – principles, assumptions, and evolution of efficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 536-554

Smiddy, Martin, Kelly, De Kruif, & Huppertz. (2006). Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase. *Journal of dairy science*, 89(6), 1906-1914.

Smithers. (2015). Whey-ing up the options—Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14.

Thömmes, & Etzel. (2007). Alternatives to Chromatographic Separations. *Biotechnology Progress*, 23(1), 42-45.

Toro-Sierra, Tolkach, & Kulozik. (2013). Fractionation of  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin from Whey Protein Isolate Using Selective Thermal Aggregation, an Optimized Membrane Separation Procedure and Resolubilization Techniques at Pilot Plant Scale. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 1032-1043.

Wang, Huang, Hsu, & Yang. (2016). Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 527-540.

Wang, Riedl, Somerville, Balasubramaniam, & Schwartz. (2011). Influence of high-pressure processing on the profile of polyglutamyl 5-methyltetrahydrofolate in selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8709-8717.

Yordanov, & Angelova. (2010). High pressure processing for foods preserving. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(3), 1940-1945.

Yver, Bonnaillie, Yee, Mcaloon, & Tomasula. (2011). Fractionation of whey protein isolate with supercritical carbon dioxide—Process modeling and cost estimation. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 240-259.

## 5 Evaluation of casein as a binding ligand protein for purification of alpha-lactalbumin from beta-lactoglobulin under high hydrostatic pressure.

---

**Marciniak, A., Suwal, S., Britten, M., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2019).** Evaluation of casein as a binding ligand protein for purification of alpha-lactalbumin from beta-lactoglobulin under high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 275, 193-196

---

### Transition contextuelle

Dans le chapitre précédent, les paramètres de pressurisation et le type de CN ont été optimisés sur des solutions modèles d' $\alpha$ -la et  $\beta$ -lg. Les paramètres de HPH de 600 MPa-300 s et l'utilisation de CI a permis d'obtenir une fraction enrichie en  $\alpha$ -la avec un taux de purification de 86 % et un rendement de 77 %. Cependant, toujours dans le but d'améliorer le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg, la concentration en ligand est à optimiser. Par conséquent, dans cette étude, les paramètres optimaux (600 MPa - 300, utilisation de CI) ont été conservés et la concentration du ligand a été optimisée.

Ce chapitre a fait l'objet d'une *short communication* intitulée :

« **Evaluation of casein as a binding ligand protein for purification of alpha-lactalbumin from beta-lactoglobulin under high hydrostatic pressure** » publiée dans le journal « *Food Chemistry* » en septembre 2018.

Les auteurs sont : Alice Marciniak (candidate au doctorat, planification et réalisation des expériences, analyses des résultats et rédaction de l'article), Shyam Suwal (post-doctorant, correction et révision du manuscrit), Guillaume Brisson (collaborateur scientifique du projet, révision du manuscrit), Michel Britten (collaborateur scientifique du projet, correction du manuscrit), Yves Pouliot (co-directeur de thèse, supervision scientifique de l'étudiant, correction du manuscrit) et Alain Doyen (directeur de thèse, supervision scientifique de l'étudiant, correction et révision du manuscrit).



## 5.1 Résumé

Le fractionnement de la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) et de l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -la) par les technologies de séparation conventionnelles reste un défi en raison de leurs poids moléculaires similaires. Dans cette étude, les caséines (CN) sont utilisées comme ligands pour spécifiquement s'agréger avec la  $\beta$ -lg sous aux hautes pressions hydrostatiques (HPH) pour séparer l' $\alpha$ -la après acidification à pH 4,6. Nous avons étudié spécifiquement l'effet de différentes concentrations de CN sur la purification et le rendement de l' $\alpha$ -la. Des solutions modèles d' $\alpha$ -la, de  $\beta$ -lg et de CN (de 0 à 5 mg/mL) ont été pressurisées (600 MPa – 300 s). Après acidification et centrifugation des solutions pressurisées, la pureté de l' $\alpha$ -la augmentait jusqu'à une valeur de 79 % avec un rendement de 88 % lorsque les CN n'étaient pas utilisées. Contrairement à notre hypothèse initiale, la présence de CN a diminué l'agrégation de la  $\beta$ -lg et sa co-précipitation avec les CN après acidification, et a réduit significativement le degré de pureté de l' $\alpha$ -la (~ 71 %). Nos résultats suggèrent donc une activité chaperonne des CN sur l'agrégation de la  $\beta$ -lg par HPH, qui nécessite des recherches plus approfondies.

## 5.2 Abstract

Fractionation of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) and  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) using conventional separation technologies remains challenging mainly due to similar molecular weight. Herein, casein (CN) was used as ligand protein to specifically aggregate  $\beta$ -lg under high hydrostatic pressure (HHP) in order to separate  $\alpha$ -la after acidification to pH 4.6. Specifically, we studied the effect of different concentration of CN on  $\alpha$ -la purity and recovery. Model solutions of  $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg and CN (from 0 to 5 mg/mL) were pressurized (600 MPa – 300 s). After acidification and centrifugation of pressure-treated solutions, purity of  $\alpha$ -la was increased up to 78% with a recovery of 88% for solution without CN. In contrast with our initial hypothesis, the presence of CN decreased  $\beta$ -lg pressure-induced aggregation and co-precipitation upon acidification and significantly reduced purity (~ 71%). Therefore, our results suggest a chaperone-like activity of CN on  $\beta$ -lg pressure-induced aggregation which needs further investigation.

### 5.3 Introduction

Alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg) are the two major whey proteins (WP) of bovine milk that represent respectively, 4 and 10% of the total proteins. These WP are of industrial importance due to their nutritional and functional properties as well as in a context of valorization of whey from dairy processing (Jouan 2002). In addition, these proteins represent an interesting source of bioactive peptides with various activities such as antimicrobial, opioid, antihypertensive, etc. (O'mahony & Fox 2013). Moreover, WP, mainly for  $\alpha$ -la, are part of key biological functions such as in milk lactose biosynthesis, or source of key amino acids involved in the synthesis of the neurotransmitters (e.g. tryptophan and serotonin) (Kamau *et al.*, 2010; O'mahony & Fox 2013; Toro-Sierra *et al.*, 2013). Although, WP present many interesting features, bovine  $\beta$ -lg, which is absent in human milk, is not desirable in infant formula due to its allergenicity (Bansal & Bhandari 2016; Kamau *et al.*, 2010; O'mahony & Fox 2013). Therefore, their separation is of growing interest for infant formula application. Nevertheless, due to their similar molecular weight (14.2 and 18.6 kDa for  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg, respectively), they are hardly fractionable using conventional industrial technologies such as membrane filtration (Bansal & Bhandari 2016; El-Sayed & Chase 2011; Smithers 2015). However, their differences in terms of structure make them more or less sensitive to various treatment such as high hydrostatic pressure (HHP). Particularly, HHP is known to maintain the protein covalent linkages associated to disulfide bonds. Thus,  $\alpha$ -la which contains 4 disulfide bonds (in comparison to 2 for  $\beta$ -lg), is more compact and thus more resistant to HHP treatment. Additionally,  $\beta$ -lg also contains one free sulfhydryl group which is also available for covalent interactions and disulfide interchanges with various milk proteins upon denaturation. Recently, we proposed a novel and ecofriendly technology for the fractionation of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg using HHP and casein (CN) as a ligand to modulate interactions between CN and  $\beta$ -lg followed by acidification to pH 4.6, corresponding to isoelectric point of CN (Marciniak, Suwal, Britten, Pouliot & Doyen 2018). In the same work, we obtained an  $\alpha$ -la enriched-fraction with 86% purity and a recovery of 77%. However, for the industrial implementation of this process, the concentration of the ligand (CN) needs to be optimized. Thus, the aim of this study was to determine the  $\alpha$ -la purification degree and recovery rate using HHP as a pre-treatment at varying CN concentration.

## 5.4 Material and Methods

The experimental design and materials and method used in the present study were similar to our previous study (Marciniak *et al.*, 2018). All experiments and analyses were made in triplicate and statistical analyses were executed using the SAS University Edition (SAS Institute Inc, Cary, NC). Tukey test ( $\alpha=0.05$ ) was performed as a comparison test. Briefly, model milk protein solutions composed of  $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg (Agropur Ingredients – La Crosse, WI) and acidic casein (CN – Sigma Aldrich St Louis, Missouri, USA – lot # SLBM5975 V) were prepared by solubilizing proteins in 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 6.6). Concentrations of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg were fixed at 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> whereas concentration of CN was varied from 0 to 5 mg.mL<sup>-1</sup> corresponding to final protein ratio ( $\alpha$ -la :  $\beta$ -lg : CN) of 1:1:0 to 1:1:2. The WP were submitted to HHP treatment (300 s 600 MPa) followed by an acidification at pH 4.6 to precipitate CN and CN- $\beta$ -lg complexes (aggregates) and centrifugation at 11000 g for 25 min. Mono-dimensional PAGE under native condition was performed to analyze aggregation profile. The protein concentrations were determined using HPLC, as described previously (Marciniak *et al.*, 2018). The recovery rates, defined as the protein concentration in the supernatant relative to its initial concentration, were calculated using equations (4) and (5) for  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg, respectively. The purification degrees, defined as the concentration of protein relative to the total concentration of proteins in the supernatant (soluble fraction) and pellet (insoluble fraction) for  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg, respectively, were calculated using the equations (6) and (7).

In supernatants:

$$\alpha - la \text{ protein recovery rate (\%)} = \frac{[\text{sup}]_{\alpha-la}}{[\text{initial}]_{\alpha-la}} \cdot 100 \quad (4)$$

$$\beta - lg \text{ protein recovery rate (\%)} = \frac{[\text{sup}]_{\beta-lg}}{[\text{initial}]_{\beta-lg}} \cdot 100 \quad (5)$$

$$\alpha - la \text{ purification degree (\%)} = \frac{[\text{sup}]_{\alpha-la}}{[\text{sup}]_{\text{total proteins}}} \cdot 100 \quad (6)$$

In pellets:

$$\beta\text{-lg purification degree (\%)} = \frac{[\text{pellet}]_{\beta\text{-lg}}}{[\text{pellet}]_{\text{total proteins}}} \cdot 100 \quad (7)$$

where [sup], [pellet] and [initial] correspond to the concentrations ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of proteins in supernatant, pellet, and initial solutions.

## 5.5 Results and Discussion

### 5.5.1 Relationship between CN concentration and protein denaturation/aggregation

Figure 22 A and B show the native PAGE profiles of pressure-treated milk protein solutions and supernatants recovered after acidification and centrifugation. While the intensity of bands corresponding to CN increase with CN concentration (Fig. 22 A), intensity of bands corresponding to  $\alpha$ -la remain constant. However, a slight increase in the band intensity of the bands related to  $\beta$ -lg was observed as the CN concentration increases. The sample with a CN concentration of  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  showed the highest band intensity indicating that  $\beta$ -lg was less associated with CN. Even though pressure-induced aggregates are not clearly visible within the gel, these aggregates could have simply been washed from the top of the wells by the migration buffer. As expected, after acidification at pH 4.6 and centrifugation of the samples (Fig. 22 B), no band corresponding to CN were detected in the gel whereas  $\alpha$ -la bands displayed a higher intensity as compared to other proteins. Although the band intensities related to  $\beta$ -lg were very light, they seemed to increase as the concentration of CN increased. These observations indicate that  $\beta$ -lg interacts less with itself and/or with CN, when more CN are used.

In strong agreement with our previous results, a higher sensitivity of  $\beta$ -lg to HHP treatment was observed in contrast to  $\alpha$ -la (Bravo *et al.*, 2013; Huppertz, Fox, *et al.*, 2004a, 2004b; Marciniak *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2006). Surprisingly, the native PAGE profiles of protein solution (Fig. 22 A) and the supernatant (Fig. 22 B) recovered after acidification at pH 4.6 where no CN were present ( $0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were similar to other samples containing CN (from  $0.625$  to  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in terms of bands corresponding to  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg. These observations are in agreement with those of Huppertz, Fox, *et al.*, (2004b) and Pizzano *et al.*, (2012), respectively upon pressurization

(600 MPa – 30 and 60 min) and heat-treatment (UHT) of whey suggesting that HHP and UHT treatment of solution containing only the WP can induce self-aggregation of  $\beta$ -lg which can be precipitated upon acidification to 4.6.

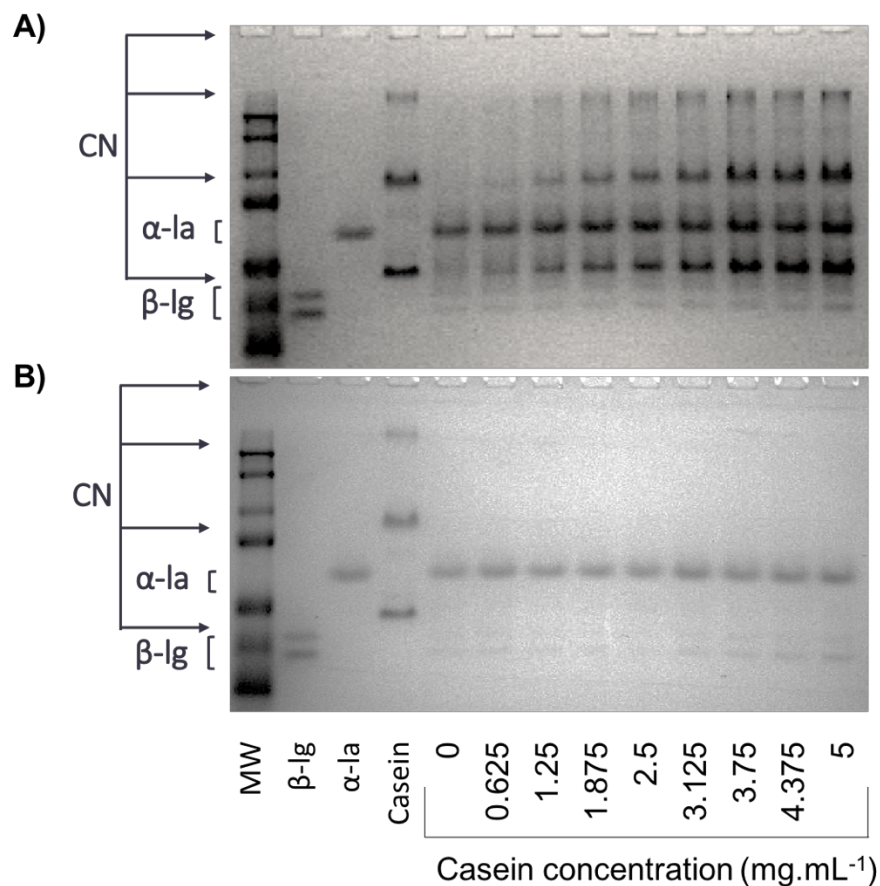


Figure 22. PAGE profile under native condition of pressure-treated (600 MPa, 300s) milk protein solutions (A) and pH 4.6-soluble fractions (supernatants) (B) at varying concentration of casein (CN) used as ligand. Concentrations of  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la remained constant at 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> each.

### 5.5.2 Protein recoveries and purification degrees

To confirm our results obtained by native-PAGE analysis, the amount of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg recovered in supernatants after acidification at pH 4.6 were determined by HPLC (Fig. 23 A). Concerning

$\alpha$ -la, no significant difference was observed whatever the concentration of CN ( $p=0.1512$ ). Indeed, the recovery rate of  $\alpha$ -la (concentration in the supernatant after acidification at pH 4.6 and centrifugation) remained constant with an average value of  $85 \pm 6.3$  %. Regardless the concentration in CN, and in contrast to results obtained for  $\alpha$ -la, the recovery rate of  $\beta$ -lg was drastically reduced by the HHP treatment decreasing its rate by 77 % as compared to its initial value. In addition, the concentration of CN had a significant impact ( $p=0.0005$ ) on  $\beta$ -lg recovery. For samples containing higher concentration of CN (i.e. from  $3.75 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) the recovery rate of  $\beta$ -lg increased significantly suggesting that a lesser amount of  $\beta$ -lg were being precipitated during acidification. Indeed,  $\beta$ -lg recovery varied from an average value of  $23 \pm 1.7$  (from 0 to  $3.125 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) to  $33 \pm 1.5$  % (from  $3.75$  to  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). These results are in accordance with what we observed previously with PAGE analyses (Fig. 22).

Our data on protein recovery rates, indicate that up to protein ratio of 1:1:1.25 (i.e. sample with  $3.125 \text{ mg.mL}^{-1}$  of CN) no difference is observed, with model protein solution without the addition of CN initially used as binding protein ligand. Our previous work (Marciniak *et al.*, 2018) and several other authors (Huppertz, Fox, *et al.*, 2004b; Pizzano *et al.*, 2012) showed that HHP and heat-treatment results in denaturation of  $\beta$ -lg which eventually aggregates with other milk proteins such as CN allowing its fractionation by simple acidification to 4.6 (isoelectric point of CN). However, the present study suggests that the self-aggregation of  $\beta$ -lg during HHP treatment could be simply enough for its precipitation without any requirement of ligands. In addition, a higher recovery rate of  $\beta$ -lg at higher concentration of CN is a strong evidence that CN could prevent the pressure induced-aggregation of  $\beta$ -lg. Numerous studies have claimed a chaperone like effect of CN (specifically  $\beta$ -CN and  $\alpha_{s1}$ -CN) on heat induced and more recently on HHP induced,  $\beta$ -lg aggregation and this phenomenon could explain the increase of  $\beta$ -lg recovery rate in high concentration of CN (He *et al.*, 2011; Yong & Foegeding 2010; Zhang *et al.*, 2005). Contradictorily, Huppertz, Fox, *et al.*, (2004b) showed that the addition of milk (and thus CN) on whey treated by HHP, leads to higher  $\beta$ -lg denaturation. Those differences might be due to the distinctions in physicochemical properties of milk/whey as compared to our model solutions in terms of protein concentration, presence of lactose and minerals (ionic strength), etc.

In terms of  $\alpha$ -la recovery, Huppertz, Fox, *et al.*, (2004b) had estimated 82 % (average value of milk:whey solutions, 1:100, 10:90, 25:75, 50:50 and 100:0) of  $\alpha$ -la was remaining in the pH 4.6 soluble fraction in comparison with 85 % (average of every WP:CN ratio) calculated in our study.

Overall, the differences between  $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg in terms of recovery rate are due to their barosensitivity that resulted in different degree of protein structural modification under HHP treatment. The presence of 4 disulfide bonds in the native structure of  $\alpha$ -la (compared to 2 in  $\beta$ -lg), lead to higher strength against denaturation, specifically during HHP treatment (Gaucheron *et al.*, 1997). As stated in our previous work, pressurization of solutions composed of  $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg and CN led specifically to the aggregation of  $\beta$ -lg with CN (Boland *et al.*, 2014; Considine *et al.*, 2007b; Marciniak *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2006). Subsequently, acidification at pH 4.6 generated precipitation of both homogenous aggregates of  $\beta$ -lg/ $\beta$ -lg or  $\beta$ -lg/CN impacting therefore the  $\alpha$ -la purification degree.

Figure 23 B shows the purification degree of  $\alpha$ -la as a function CN concentration. Statistical analyses showed a significant impact of CN at higher concentration ( $p=0.0033$ ). At lower concentration of CN (i.e. up to  $3.125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $\alpha$ -la purification degree remained more or less constant with an average value of  $78 \pm 0.4 \%$ . While at  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , the purification degree decreased down to  $71 \pm 1.4 \%$ . Indeed, as  $\alpha$ -la recovery (concentration) remains constant,  $\beta$ -lg recovery increases for higher CN amount, which indicate that for the same amount of  $\alpha$ -la, there is a higher amount of total proteins in the supernatant. Although the highest purification degree of  $\alpha$ -la was found to be  $79 \pm 2.8 \%$  when  $1.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of CN was used, no statistical difference was observed in comparison to sample with no CN ( $78 \pm 1.0 \%$ ). Therefore, the condition without CN turns out to be the most interesting for industrial application. Thus, this  $\alpha$ -la purification degree remains competitive with conventional methods such as chromatography and membrane separation techniques while reaching a higher  $\alpha$ -la recovery ( $88 \pm 8.9 \%$  in this study in comparison with 36 % by using ion exchange chromatography, 48 and 35 % by using affinity

chromatography or 15 % by using tryptic digestion followed by ultrafiltration) (El-Sayed & Chase 2011).

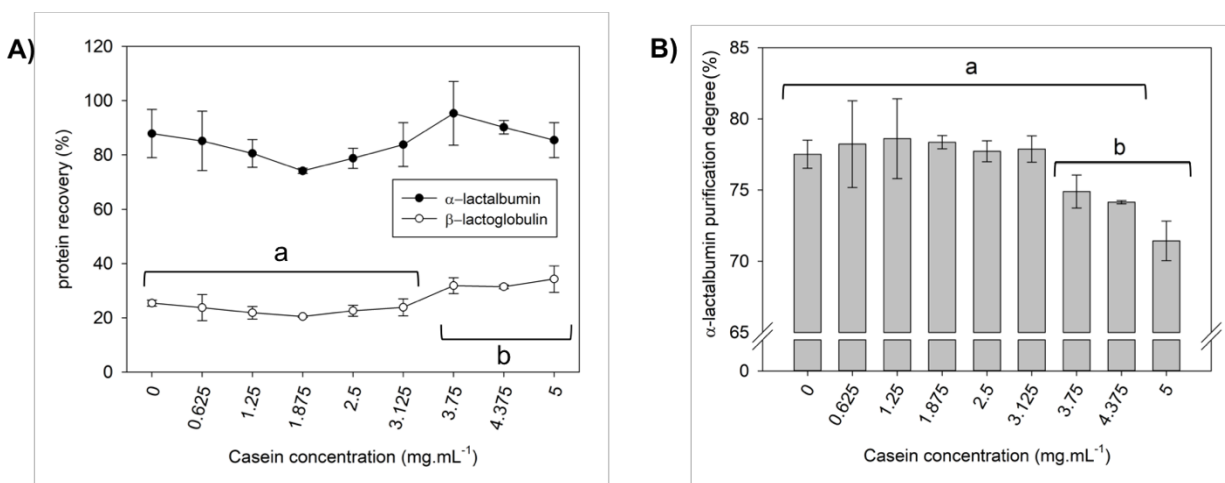


Figure 23. Effect of the concentration of casein on the recovery of alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la – black circle) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg – white circle) remaining in the supernatant after an acidification at pH 4.6 (A) and on the alpha-lactalbumin purification degree (B). Concentration of each WP was maintain at 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>. Bars show the standard deviation of mean values of multiple replicates (n=3). Each comparison has been made by proteins ( $\alpha$ -la and  $\beta$ -lg) (Tukey test;  $\alpha = 0.05$ ). \*Mean values with significant difference.

In addition to the production of an  $\alpha$ -la enriched soluble fraction, the insoluble fraction (pellet) enriched with  $\beta$ -lg was produced after acidification to pH 4.6. The purification degree of  $\beta$ -lg in the fraction was found to largely depend on the concentration of CN used. Table 13 shows the purification degree of  $\beta$ -lg in the pellets as a function of CN concentration. Even though,  $\alpha$ -la purification degree remained unchanged for CN concentration up to 3.125 mg.mL<sup>-1</sup>,  $\beta$ -lg purification degree decreased drastically from 87 to 23 % with the increase of CN concentration from 0 to 5 mg.mL<sup>-1</sup>. As expected, pellet of sample with no CN showed the highest  $\beta$ -lg purity



( $87 \pm 8.67$  %), confirming that this condition is the most interesting in terms of whey protein fractionation.

Table 13.  $\beta$ -lg purification degree in pellets as a function of casein concentration

Casein concentration (mg.mL <sup>-1</sup> )	$\beta$ -lg purification degree in pellet (%)
0	$87 \pm 8.67$ <sup>a</sup>
0.625	$66 \pm 5.85$ <sup>b</sup>
1.25	$53 \pm 2.49$ <sup>c</sup>
1.875	$44 \pm 0.32$ <sup>d</sup>
2.5	$39 \pm 0.11$ <sup>d,e</sup>
3.125	$35 \pm 0.52$ <sup>e,f</sup>
3.75	$31 \pm 0.91$ <sup>f,g</sup>
4.375	$27 \pm 0.07$ <sup>g</sup>
5	$23 \pm 0.80$ <sup>g</sup>

Mean value  $\pm$  standard deviation. Multiple comparisons were made using Tukey test ( $\alpha=0.05$ ) for multiple replicates (n=3). Values with different letters are significantly different.

## 5.6 Conclusion

Our results demonstrated that the increase in ligand (CN) concentration had a significant impact on  $\beta$ -lg aggregation under HHP treatment (300 s 600 MPa), whereas  $\alpha$ -la remains unaffected. As a matter of fact, the increase in CN concentration or protein ratio (above 3.125 mg.mL<sup>-1</sup>) reduced the pressure induced denaturation/aggregation of  $\beta$ -lg. This could most probably be due to a chaperone-like effect of CN such as  $\alpha_{s1}$ -CN and  $\beta$ -CN. In fact, these CN lack thiols free group and possess hydrophobic nature which are typical characteristics of chaperone-like proteins. More surprisingly, the use of HHP on model protein solutions without addition of CN, generated  $\beta$ -lg aggregates which turns out to be insoluble and consequently precipitate after acidification and centrifugation. Under this condition,  $\alpha$ -la purification degree reaches  $78 \pm 1.0$  % with protein recovery of  $88 \pm 8.9$  % for  $\alpha$ -la. In addition, this condition generates a highly valuable coproduct (pellet) mainly composed of  $\beta$ -lg with a purification degree of  $87 \pm 8.7$  %. Overall,

this study demonstrates the strong potential of using HHP alone as a pre-treatment of cheese whey to fractionate  $\alpha$ -la from cheese whey.

### **5.7 Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

### **5.8 Acknowledgements**

The authors acknowledge Agropur Ingredients (La Crosse, WI) for whey protein powders as well as the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for financial support.

### **5.9 References**

Bansal, N., & Bhandari, B. (2016). Functional Milk Proteins: Production and Utilization—Whey-Based Ingredients. In P. L. H. McSweeney & J. A. O'Mahony (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects* (pp. 67-98). New York, NY: Springer New York.

Boland, M., Singh, H., & Thompson, A. (2014). *Milk Proteins: From Expression to Food* (2 ed.): Elsevier Science.

Bravo, F. I., Felipe, X., Lopez-Fandino, R., & Molina, E. (2013). High-pressure treatment of milk in industrial and pilot-scale equipments: effect of the treatment conditions on the protein distribution in different milk fractions. *European Food Research and Technology*, 236(3), 499-506.

Considine, T., Patel, H. A., Anema, S. G., Singh, H., & Creamer, L. K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments—a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 1-23.

El-Sayed, M. M., & Chase, H. A. (2011). Trends in whey protein fractionation. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1501-1511.

Gaucheron, F., Famelart, M. H., Mariette, F., Raulot, K., Michela, F., & Le Graeta, Y. (1997). Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chemistry*, 59(3), 439-447.

He, J.-S., Zhu, S., Mu, T.-H., Yu, Y., Li, J., & Azuma, N. (2011).  $\alpha$  s-casein inhibits the pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin through its molecular chaperone-like properties. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1581-1586.

Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2004a). High pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *The Journal of dairy research*, 71(1), 97-106.

Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2004b). High pressure-induced denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research*, 71(04), 489-495.

Jouan, P. (2002). *Lactoprotéines et lactopeptides: Propriétés biologiques: Quae.*

Kamau, S. M., Cheison, S. C., Chen, W., Liu, X. M., & Lu, R. R. (2010). Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 197-212.

Marciniak, A., Suwal, S., Britten, M., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2018). The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of an alpha-lactalbumin enriched-fraction. *Green Chemistry*, 20(2), 515-524.

O'Mahony, J., & Fox, P. (2013). Milk proteins: Introduction and historical aspects. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 43-85): Springer.

Patel, H. a., Singh, H., Anema, S. G., & Creamer, L. K. (2006). Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3409-3420.

Pizzano, R., Manzo, C., Adalgisa Nicolai, M., & Addeo, F. (2012). Occurrence of major whey proteins in the pH 4.6 insoluble protein fraction from UHT-treated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 8044-8050.

Smithers, G. W. (2015). Whey-ing up the options—Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14.

Toro-Sierra, J., Tolkach, A., & Kulozik, U. (2013). Fractionation of  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin from Whey Protein Isolate Using Selective Thermal Aggregation, an Optimized Membrane Separation Procedure and Resolubilization Techniques at Pilot Plant Scale. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 1032-1043.

Yong, Y. H., & Foegeding, E. A. (2010). Caseins: Utilizing Molecular Chaperone Properties to Control Protein Aggregation in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 685-693.

Zhang, X., Fu, X., Zhang, H., Liu, C., Jiao, W., & Chang, Z. (2005). Chaperone-like activity of  $\beta$ -casein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(6), 1232-1240.

## 6 Studying a chaperone-like effect of beta-casein on pressure-induced aggregation of beta-lactoglobulin in the presence of alpha-lactalbumin.

---

**Marciniak, A., Suwal, S., Britten, M., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2018).** Studying a chaperone-like effect of beta-casein on pressure induced aggregation of beta-lactoglobulin in the presence of alpha-lactalbumin. *Food Hydrocolloids*, 84, 9-15.

---

### Transition contextuelle

Dans le précédent chapitre, il a été démontré que la concentration en CN avait un impact sur le degré de purification de l' $\alpha$ -la dans la fraction finale. En effet, alors que la pressurisation des protéines sériques seules et avec des CN, jusqu'à une concentration de  $3,125 \text{ mg.mL}^{-1}$  n'a pas d'impact sur le taux de purification de l' $\alpha$ -la, l'augmentation de la concentration des CN entraînait une diminution significative du degré de purification de l' $\alpha$ -la. Cette diminution est due à une agrégation moins importante de la  $\beta$ -lg en présence d'une grande quantité de CN ( $> 3,125 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Ces résultats suggèrent un effet chaperon des CN sur l'agrégation par les HPH de la  $\beta$ -lg. Parmi les CN, la  $\beta$ -CN présente des caractéristiques bien propres aux protéines chaperonnes. Dans cette étude, l'effet chaperon de la  $\beta$ -CN sur l'agrégation par HPH de la  $\beta$ -lg en présence d' $\alpha$ -la a été étudié.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé :

« **Studying a chaperone-like effect of beta-casein on pressure-induced aggregation of beta-lactoglobulin in the presence of alpha-lactalbumin** » publié dans le journal « *Food Hydrocolloids* » en mai 2018.

Les auteurs sont : Alice Marciniak (candidate au doctorat, planification et réalisation des expériences, analyses des résultats et rédaction de l'article), Shyam Suwal (post-doctorant, correction et révision du manuscrit), Guillaume Brisson (collaborateur scientifique du projet, révision du manuscrit), Michel Britten (collaborateur scientifique du projet, correction du manuscrit), Yves Pouliot (codirecteur de thèse, supervision scientifique de l'étudiant, correction

du manuscrit) et Alain Doyen (directeur de thèse, supervision scientifique de l'étudiant, correction et révision du manuscrit).

## 6.1 Résumé

L'agrégation des protéines peut être désirée pour améliorer la fonctionnalité dans certaines matrices alimentaires, spécifiquement dans les systèmes gélifiés. Cependant, dans l'industrie des boissons, ce phénomène est généralement non désiré puisqu'il est souvent associé à une insolubilité des protéines et à une turbidité du milieu. Toutefois, des recherches ont associé aux protéines laitières des propriétés similaires à celles des molécules chaperonnes pour aider à éviter l'agrégation des protéines. Dans cette étude, nous avons investigué l'effet de la bêta-caséine ( $\beta$ -CN) sur l'agrégation par hautes pressions hydrostatiques (HPH) de la bêta-lactoglobuline ( $\beta$ -lg) dans des solutions modèles par le moyen d'analyses qualitatives et quantitatives (turbidité, SDS-PAGE, SEC-HPLC et TEM). Les solutions protéiques modèles comprenant des ratios différents d'alpha-lactalbumine ( $\alpha$ -la),  $\beta$ -lg et  $\beta$ -CN ont été pressurisées. Le traitement aux HPH de la  $\beta$ -lg seule, a généré une solution présentant une grande turbidité et comprenant de larges agrégats alors que l'ajout des deux autres protéines ( $\alpha$ -la et  $\beta$ -CN) à différents ratios a permis de réduire considérablement la turbidité des solutions malgré la présence d'agrégats beaucoup plus larges. En effet, l'analyse par TEM a montré la présence de larges agrégats amorphes lorsque la  $\beta$ -lg est pressurisée avec l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -CN, contrairement aux agrégats denses et globulaires pour la  $\beta$ -lg seule. L'analyse des agrégats par fractionnement (SEC-HPLC) suivi de SDS-PAGE ont mis en avant que la  $\beta$ -lg n'était pas directement impliquée dans l'agrégation de la  $\beta$ -lg, suggérant un effet chaperon de la  $\beta$ -CN sous HPH. Nos expériences effectuées sur solutions modèles ont démontré que l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -CN inhibaient la formation d'agrégats insolubles qui s'accompagnait d'une diminution de la turbidité, par traitement aux HPH de la  $\beta$ -lg, ce qui pourrait être intéressant dans le cas de boissons enrichies en protéines laitières.

**Mots-clés :** protéine chaperonne, hautes pressions hydrostatiques, protéines laitières

## 6.2 Abstract

Protein aggregation can be used to improve functionality in certain food systems, especially in gelled systems. However, in beverages application, this phenomenon is generally undesirable since it is usually related to protein insolubility and turbidity. Nonetheless, some research has demonstrated a molecular chaperone-like property of certain milk proteins that helps avoid protein aggregation. Here, we investigated the effect of beta-casein ( $\beta$ -CN) on pressure-induced aggregation of beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg) in whey solution using various qualitative and quantitative analyses (turbidity, SDS-PAGE, HPSEC and TEM). Protein model solutions containing different ratios of alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la),  $\beta$ -lg and  $\beta$ -CN were pressurized by high hydrostatic pressure (HHP). Pressure treatment of  $\beta$ -lg alone generated a highly turbid solution containing large aggregates while the addition of both proteins ( $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN) at different ratios led to a drastic decrease in turbidity, despite the presence of larger aggregates. In fact, TEM analysis showed larger and amorphous aggregates for  $\beta$ -lg with  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN, and globular, denser aggregates for  $\beta$ -lg alone. Further analysis of these aggregates by fractionation (HPSEC) followed by SDS-PAGE showed no  $\beta$ -CN directly involved in  $\beta$ -lg aggregation, suggesting a chaperone-like effect of  $\beta$ -CN under HHP. Our experiments, performed on model dairy solutions, demonstrated that  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN inhibits the formation of insoluble aggregates (decreases turbidity) under HHP treatment of  $\beta$ -lg that could be relevant in milk protein fortified beverages.

**Keywords:** chaperone protein, high hydrostatic pressure, dairy proteins.

## 6.3 Introduction

The two major whey proteins (WP), alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg), are widely used in the food industry for their nutritional (essential amino acids (AA)) and functional (emulsification, gelation) properties (Jouan 2002). In whey,  $\alpha$ -la, is of great interest for its use in infant formula to closely mimic human milk protein composition. Its primary structure contains 8 cysteine residues forming 4 disulfide bonds which provide high stability during denaturing

treatments. Furthermore, the absence of a free thiol residue makes  $\alpha$ -la less sensitive to disulfide bond interchange reactions. Conversely,  $\beta$ -lg structure is characterized by a hydrophobic pocket buried in its core which allows interactions between various hydrophobic molecules (Farrell *et al.*, 2006). The presence of 5 cysteine residues in  $\beta$ -lg leads to the formation of two disulfide bonds and one free thiol residue positioned in the heart of the protein, limiting its reactivity with other proteins. However, the use of a variety of physicochemical treatments such as high hydrostatic pressure (HHP) could expose the  $\beta$ -lg reaction sites (hydrophobic and/or free thiol residue). HHP is an emerging technology used in a range of applications including cold pasteurization (preservation), protein fractionation (Marciniak *et al.*, 2018), and production of bioactive peptides.

Proteins respond differently to applied pressure according to their physicochemical properties. Indeed,  $\beta$ -lg, which possesses two disulfide-bonds (in contrast to 4 for  $\alpha$ -la), is more sensitive to high pressure. Also, it is well known that  $\beta$ -lg auto-aggregates under HHP treatment from 150 MPa by losing its native conformation (unfolding) and exposing its hydrophobic pocket resulting in extensive protein-protein interactions through disulfide-bonds. In contrast,  $\alpha$ -la is sensitive only to pressures above 400 MPa and forms aggregates under pressure above 800 MPa when pressurized alone. However, with other proteins that contain a free reducing thiol group (e.g.  $\beta$ -lg),  $\alpha$ -la can be part of some aggregates through thiol-disulfide interchange when pressurized at lower pressure ( $P < 800$  MPa) (Boland *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2013, 2015; Considine *et al.*, 2007b; Marciniak *et al.*, 2018; Mazri *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2006).

Protein aggregation is a complex phenomenon which is desirable in some cases to ensure protein functionality such as gelation. On the other hand, it is unwanted in protein fortified beverages as it often leads to an opaque appearance generally assimilated to insolubility. This is why numerous studies have focused on the chaperone-like effect of proteins in order to inhibit  $\beta$ -lg aggregation mainly under heat treatment. In terms of biological role, a molecular chaperone protein should interact with the aim protein without being part of its final structure through assisting the folding and unfolding and inhibit protein aggregation under stress conditions (Hartl



*et al.*, 2011; He *et al.*, 2011). To the best of our knowledge, there is only one study that investigated the chaperone-like activity of  $\alpha_s$ -casein under HHP treatment (He *et al.*, 2011). Among milk proteins, beta-casein ( $\beta$ -CN), a highly hydrophobic protein is known to possess a promising characteristic of chaperone-like activity (Yong & Foegeding 2008; Yousefi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005).

As review by Yong and Foegeding (2010) most of the study on caseins and their molecular chaperone properties under various stresses (heat, chemical and light) based their assumptions solely on apparent turbidity monitored by optical density measurements (absorbance at 360, 400 or 600 nm). However, recently Hall *et al.*, (2016) stated that the turbidity measurement and its correlation with aggregation can be misleading as turbidity is a function of molecular weight, shape, volume of the aggregates as well as refractive index difference between the particle and solvent. Depending on the structure of the aggregate generated, amorphous, fibrous or oligomeric, the necessary checks should be performed to determine whether a linear relationship exists between turbidity and aggregation (Hall *et al.*, 2016) especially in food applications containing more than one protein, such as in dairy ingredient fractionations or formulations, it is also necessary to study the combined effect of more than one protein. Therefore, the objective of this study was to characterize the chaperone-like activity of  $\beta$ -CN during pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lg in the presence of  $\alpha$ -la using HHP.

## **6.4 Materials and Methods**

### **6.4.1 Materials**

Alpha-lactalbumin (batch # JE 022-4-410) and  $\beta$ -lg (batch # JE 001-1-922) were kindly provided by Agropur Ingredients (La Crosse, WI). Beta-casein (lot # SLBS9719 and SLBN8470V) with a protein content of  $\geq 98\%$  was purchased from Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, USA).

## 6.4.2 Preparation of protein model solutions

Different concentration ratios of  $\alpha$ -la: $\beta$ -lg: $\beta$ -CN were prepared by solubilizing protein powders individually in 0.2M Tris-HCl buffer at pH 6.6, as summarized in Table 14. The protein concentrations were similar to our previous work where  $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg and CN were used at a concentration of 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> each to achieve a ratio of 1:1:1 (Marciniak *et al.*, 2018). The concentration of  $\beta$ -CN in the solution corresponds to 0.875 mg.mL<sup>-1</sup> according to its relative abundance in micellar casein (i.e.  $\approx$  35%). Therefore, in the present study, the concentration of  $\beta$ -CN was varied from 0.219 to 1.75 mg.mL<sup>-1</sup>, corresponding to protein ratios of 0.25 to 2 (Table 14, sample 7 to 11).

Table 14. Composition of different protein model solutions and their relative ratios containing alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -la), beta-lactoglobulin ( $\beta$ -lg) and beta-casein ( $\beta$ -CN). Samples 1-3, 4-6 and 7-11 contain respectively one, two and three proteins in the solution.

Sample	$\alpha$ -la	$\beta$ -lg	$\beta$ -CN	Ratio
1	1	0	0	1:0:0
2	0	1	0	0:1:0
3	0	0	1	0:0:1
4	1	1	0	1:1:0
5	1	0	1	1:0:1
6	0	1	1	0:1:1
7	1	1	0.25	1:1:0.25
8	1	1	0.5	1:1:0.5
9	1	1	0.75	1:1:0.75
10	1	1	1	1:1:1
11	1	1	2	1:1:2
12 - Buffer	0	0	0	0:0:0

## 6.4.3 HHP treatment

Each protein model solution (1 to 12) was transferred into a plastic bag for HHP treatment (600 MPa, 5 min) at room temperature. A pilot-scale system, ISO-LAB model S-IL-085-O9-AO from Stansted (Essex, UK) with a stainless-steel pressure vessel of 500 mL, was used for all

pressurization experiments. Pressurization was achieved with a come-up rate of 50 MPa per minute, whereas, the decompression was instantaneous (< 2sec). The pressure transmission medium consisted of a mixture of glycol/water (30/70 %). Pressure-treated solutions were then collected for further analyses. Each treatment was performed in quadruplicate.

#### **6.4.4 Turbidity measurement**

Turbidity of initial (control), and pressure-treated solutions was monitored at 360, 400 and 595 nm with a Thermo LabSystems Multiskan Spectrum Microplate UV/VIS reader (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Samples (200  $\mu$ L) of each solution were analyzed in transparent 96 well microplates from Greiner Bio-One (Kremsmünster, Austria).

#### **6.4.5 Composition of pressure-treated milk protein solutions**

A high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) system was used to fractionate and characterize protein aggregates generated by HHP treatment on pressurized solutions. We used an ENrich™ SEC 650 column from Bio-Rad (Hercules, California, USA) and an HPLC system from Agilent Technologies (1100 series, Palo Alto, California, USA). Running parameters and gel filtration standards were the same as described by Marciniak *et al.*, (2018). Different fractions of protein aggregates, based on the HPSEC peaks profile were collected and lyophilized using a Freeze Dry System / Freezone 4.5 (Labconco, Kansas City, Missouri, USA). After resolubilization in 200  $\mu$ L of deionized water, fractions were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions.

#### **6.4.6 Determination of protein profiles and composition of milk protein aggregates**

Mono-dimensional SDS-PAGE (12%) under native conditions was performed on initial and pressurized solutions to determine protein profiles after HHP treatment. Reduced SDS-PAGE (12%) was carried out on fractions recovered from HPSEC to analyze the composition of each peak. Running parameters, staining and destaining steps were as described by Marciniak *et al.*,

(2018). Images were taken using a ChemiDoc™ MP camera from Bio-Rad (Hercules, California, USA).

#### **6.4.7 Transmission electron microscopy**

Transmission electron microscopy (TEM) was performed on pressure-treated solutions of interest. The TEM samples were first diluted one in ten and prepared by successively placing a droplet of pressure-treated solution and 3% uranium acetate onto Formvar film coated 200 mesh nickel grids and drying in air. A JEOL JEM-1230 TEM (Tokyo, Japan) operating at 80 kV was used for imaging. A Gatan camera ultrascan US1000SP1 (Gatan, Inc., Pleasanton, CA, USA) was used for image capture and images were analyzed using Gatan digital micrograph 2.11 software.

### **6.5 Results and Discussion**

#### **6.5.1 Effect of HHP on turbidity depending on protein composition**

The visual appearance of all protein model solutions studied is shown in Figure 24, both before (control) and after HHP treatment at 600 MPa for 5 min. No turbidity was observed for control solutions and no visual differences between them were noted. However, pressure-treated solutions exhibited varying opacity depending on protein composition. Pressure treatment of  $\alpha$ -la or  $\beta$ -CN (1:0:0 and 0:0:1) produced similar visual appearances as the controls. Conversely, solutions containing  $\beta$ -lg were highly turbid after pressurization. The addition of either  $\alpha$ -la or  $\beta$ -CN did not change the turbidity of  $\beta$ -lg solutions, however, the apparent turbidity decreased considerably in pressure treated  $\beta$ -lg solutions containing both  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN, especially as the concentration of  $\beta$ -CN increased.

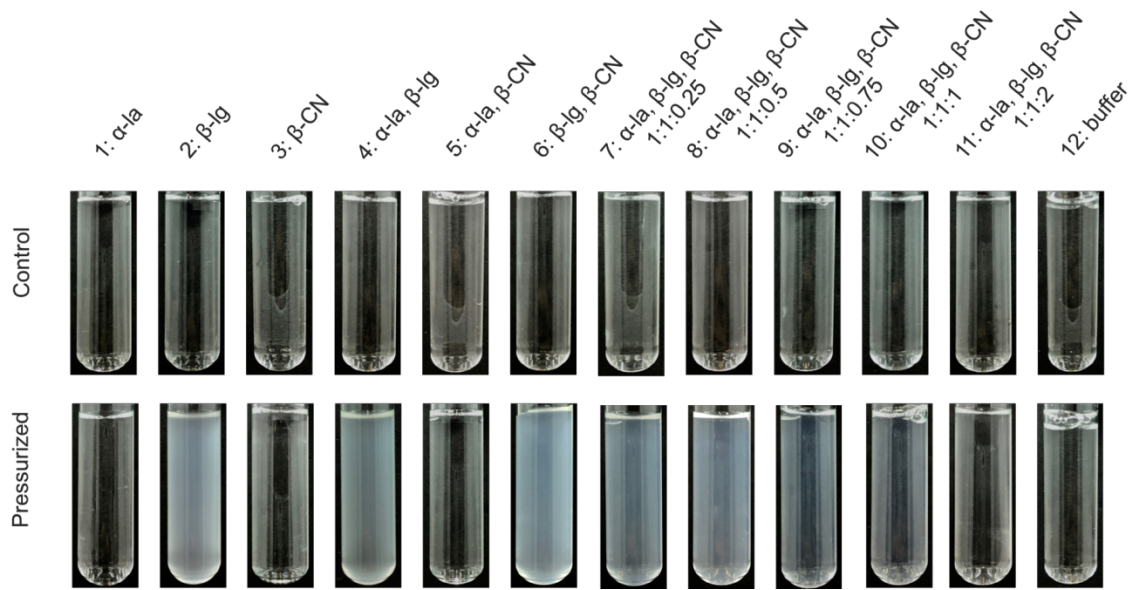


Figure 24. Visual appearances of model protein solutions (*alpha*-lactalbumin, *beta*-lactoglobulin, and *beta*-casein) at different ratios, before (control, upper panel) and after HHP (pressurized, lower panel).

Protein aggregation and, inversely, chaperone-like activity is usually assessed by measuring the absorbance at 360 nm ( $A_{360}$ ). As with the visual observations of turbidity, the  $A_{360}$  values were very low for control solutions (Figs. 25 and 26) while the  $A_{360}$  of pressurized  $\beta$ -lg (0:1:0) alone had the highest absorbance and turbidity (Fig. 25), demonstrating self-aggregation under HHP. No change in absorbance was detected for pressurized solutions of  $\beta$ -CN (0:0:1) and  $\alpha$ -la (1:0:0) alone compared to untreated solutions. These results agree with the published literature on the effect of HHP on milk proteins. Indeed, the  $\alpha$ -la structure has 4 disulfide bonds, compared to  $\beta$ -lg, which contains only two, giving  $\alpha$ -la greater rigidity and stability under HHP treatment (Gaucheron *et al.*, 1997). The  $\beta$ -CN protein lacks tertiary structure and has little ordered secondary structure, thus, is not affected by HHP (Dickinson, Murray & Pawlowsky 1997). However, when either  $\alpha$ -la or  $\beta$ -CN is present in solution with  $\beta$ -lg, the apparent  $A_{360}$  of pressure-treated solution decreases by about 40-45% (respectively, from 0.847 to 0.515 and 0.468). Furthermore, the addition of both proteins ( $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN) leads to a large decrease in  $A_{360}$  (0.039), suggesting negligible or nonexistent aggregation of  $\beta$ -lg. Similar trends were observed with absorbance measured at 400 and 595 nm (data not shown).

To determine the effect of  $\beta$ -CN concentration, the absorbance ( $A_{360}$ ) of pressurized and control solutions as a function of  $\beta$ -CN concentration were measured (Fig. 26). As  $A_{360}$  values decreased with increasing  $\beta$ -CN concentration (for 1:1:0 to 1:1:2), these results suggest that  $\beta$ -CN prevents the pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la, in a concentration-dependent manner. Numerous studies on chaperone-like activity of proteins are solely based on the measurement of  $A_{360}$  (Hall *et al.*, 2016; O'kennedy & Mounsey 2006; Yong & Foegeding 2010; Yousefi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005). Based on the literature, our results strongly suggest that  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN inhibit the aggregation of  $\beta$ -lg under high pressure through chaperone like activity. However, more recently, Hall *et al.*, (2016) advised caution in using turbidity (absorbance) measurement as a sole descriptor of protein aggregation reactions without other supporting evidence, especially in the presence of multiple proteins. The authors highlighted that turbidity is a function of molecular weight, shape and volume trace of the aggregates. Depending on the nature of the aggregation mechanism different types or structure of protein aggregates may be generated such as amorphous, fibrous or oligomeric (crystalline) (Hall *et al.*, 2016). Therefore, further analyses, HPSEC, SDS-PAGE and TEM, were performed in order to elucidate the chaperone-like effect of  $\beta$ -CN on  $\beta$ -lg aggregation under HHP in the presence of another major whey protein,  $\alpha$ -la.

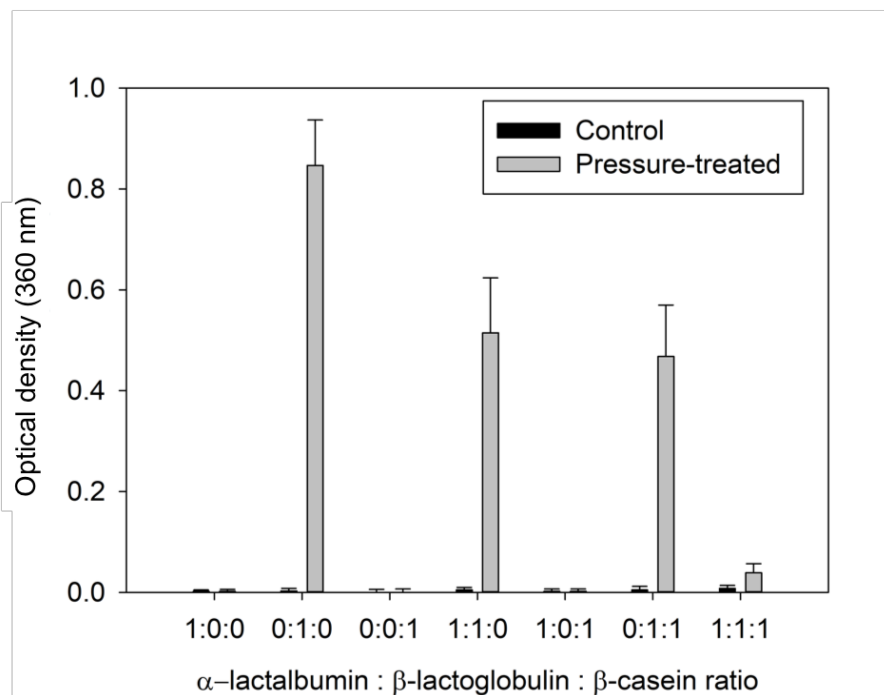


Figure 25. Optical density (360 nm) of different model protein solutions composed of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and beta-casein before (control) and after HHP treatment (pressure-treated).

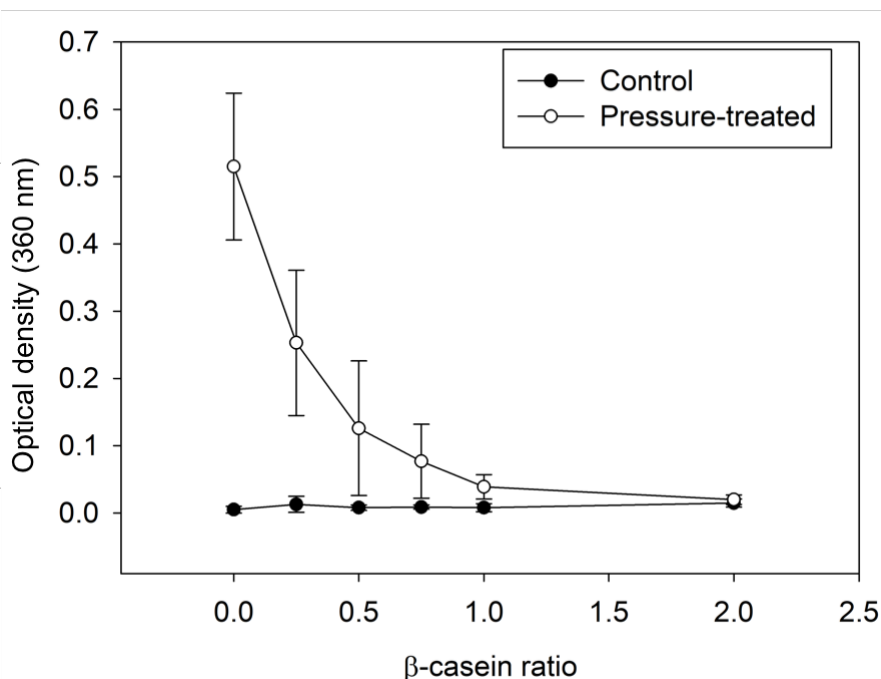


Figure 26. Optical density (360 nm) of model protein solutions at a 1:1 ratio of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin and varying amounts of beta-casein before (control) and after HHP treatment (pressure-treated).

### 6.5.2 Relationship between protein composition and aggregation induced by hydrostatic pressurization.

Native SDS-PAGE was performed on control and pressure-treated milk protein solutions for all protein combinations (Fig. 27) to determine whether or not the presence of  $\alpha$ -la and/or  $\beta$ -CN inhibits the pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lg. Firstly, the apparent molecular weight of proteins appeared in the SDS-PAGE gels were different from published values, mainly due to the use of denaturing agents in the molecular weight control, whereas, our samples did not contain

any. In addition, the electrophoretic mobility of proteins may vary according to their degree of association with SDS. In the present study, the bands in the gel were attributed to different proteins based on the mobility of control samples containing single protein (1:0:0, 0:1:0 and 0:0:1) and were verified with other analyses (SEC-HPLC and native PAGE – data not shown). No differences and, thus, no aggregation was observed for control and pressure-treated solutions of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN alone or in combination, (lanes corresponding 1:0:0, 0:0:1 and 1:0:1, respectively in Fig. 27), confirming the resistance of these proteins under HHP. In contrast, large aggregates (Fig. 27 – X<sub>2</sub>) were observed for  $\beta$ -lg (lanes 0:1:0) due to HHP treatment while the intensity of bands corresponding to monomer protein decreased considerably. Previously, the apparent A<sub>360</sub> (Fig. 25) for this sample was the highest, confirming the presence of large aggregates in pressure-treated  $\beta$ -lg solution. Among these aggregates, an intense band appeared in the region of  $\beta$ -CN (close to 25 kDa). As this solution contained only  $\beta$ -lg, this band could be due to the formation of oligomers (e.g., dimers of 36 kDa). Similarly, aggregates (X<sub>2</sub>) were observed for different combinations of  $\beta$ -lg with  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN, such as 1:1:0 and 0:1:1. As no effect was noticed for pressurization of  $\beta$ -CN alone (0:0:1), the increased intensity of the band near 25 kDa for these samples is due to  $\beta$ -lg aggregation.

The decrease in A<sub>360</sub> and visual turbidity of pressure-treated solutions (Figs. 24 and 26) as the  $\beta$ -CN concentration increased suggested that  $\beta$ -lg aggregation in the presence of  $\alpha$ -la was dependent on the concentration of  $\beta$ -CN, with total inhibition of aggregation at a ratio of 1:1:2. Nevertheless, native SDS-PAGE (Fig. 27) of pressure-treated solutions from 1:1:0 to 1:1:2 revealed the presence of large aggregates either stuck in the loading well (indicated as X<sub>1</sub>) or within the gel (X<sub>2</sub>). These pressure-induced aggregates do not seem to contain proteins other than  $\beta$ -lg as the band intensity of  $\alpha$ -la remains unchanged. Furthermore, the intensity of bands corresponding to  $\beta$ -CN (close to 25 kDa) increased after pressurization which is due to the presence of the same  $\beta$ -lg aggregates as observed for other samples (e.g. 0:1:0).



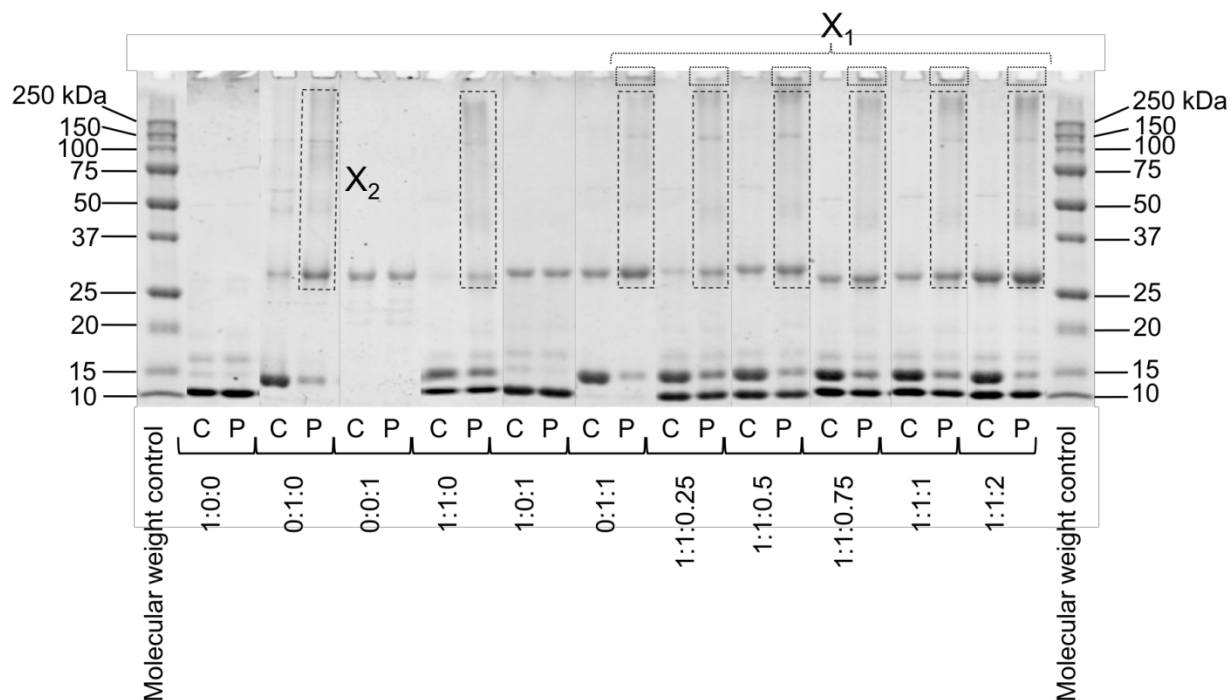


Figure 27. SDS-PAGE under native conditions of control (C) and pressure-treated (P) model protein solutions composed of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and beta-casein at different ratios. Large aggregates were identified as  $X_1$  and  $X_2$ , where  $X_1$  corresponds to protein stuck in the loading well while  $X_2$  corresponds to large aggregates mainly formed during HHP treatment of beta-lactoglobulin,

Our absorbance and turbidity results (Figs. 24 and 26), which suggested the inhibition of  $\beta$ -lg aggregation in the presence of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN, seem to contradict the SDS-PAGE data (Fig. 27), which shows large aggregates for the same samples. According to numerous authors, a molecular chaperone protein should possess various properties. Besides inhibiting/suppressing protein aggregation under stress conditions, a molecular chaperone also interacts with the protein of interest without being part of its final structure (He *et al.*, 2011). One of the main reasons behind the non-linear relationship between aggregation and turbidity could be due to the formation of different types/structures of aggregates, depending on the types of proteins and their concentrations, as suggested by Hall *et al.*, (2016). In addition, as stated by Bhattacharyya and Das (1999) and observed by He *et al.*, (2011) this could be due to the generation of soluble aggregates during HHP treatment which were not detected by  $A_{360}$ , in contrast to insoluble

aggregates. To characterize the size, morphology and composition of aggregates, TEM and HPSEC analyses were performed.

### 6.5.3 Morphology of pressure-induced aggregates

To test our first hypothesis that the addition of  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN to  $\beta$ -lg would change the shape and structure of aggregates, samples of solutions with or without  $\beta$ -CN and/or  $\alpha$ -la were analyzed by transmission electron microscopy after HHP treatment (Fig. 28). Samples containing only  $\beta$ -lg produced a homogeneous distribution of small globular aggregates (Fig. 28 – 0:1:0). However, the addition of either  $\alpha$ -la (1:1:0) or  $\beta$ -CN (0:1:1) decreased the size of these aggregates. Similar observations were made previously by Kehoe and Foegeding (2010), Kehoe and Foegeding (2014) and Yong and Foegeding (2008) for heat-induced aggregates of  $\beta$ -lg (Kehoe & Foegeding 2010, 2014; Yong & Foegeding 2008). These results agree with those obtained by absorbance analysis which showed a considerable decrease in  $A_{360}$  for samples with  $\alpha$ -la (1:1:0) and  $\beta$ -CN (0:1:1) compared to  $\beta$ -lg, alone (0:1:0). However, once the three proteins were combined, the structures and sizes of the aggregates were completely different from the single or binary mixtures. For the sample with the lowest  $\beta$ -CN concentration (1:1:0.25), a network (even at 10K – data not shown) of long rod-shaped aggregates leading to the formation of larger but amorphous structures was observed. The formation of these networks was more pronounced as the  $\beta$ -CN concentration increased (e.g., 1:1:0.5 and 1:1:1). In fact, the appearance of the dense, amorphous aggregates correlated with the increase in the  $\beta$ -CN ratio (Fig. 28 - 1:1:0.5 and 1:1:1). Therefore, our results suggest that when  $\beta$ -lg is present alone or with either  $\alpha$ -la or  $\beta$ -CN, HHP treatment causes the formation of homogeneously distributed crystalline/globular structured aggregates that produce a hazy (foggy) appearance in solution. This haze perturbs the intensity of light as it passes through the aggregates (shown by less white background in Fig. 28) (Hall *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). Conversely, mixtures of the three proteins produce non-linear, heterogenous, amorphous aggregates under HHP that are representative of clouds in the solution, where light can easily pass through. These phenomena explain the results obtained previously. Hall *et al.*, (2016) and Zhao *et al.*, (2016) outlined the possibility to form different types of aggregates in a heterogenous mixture of proteins and their consequences in turbidity.

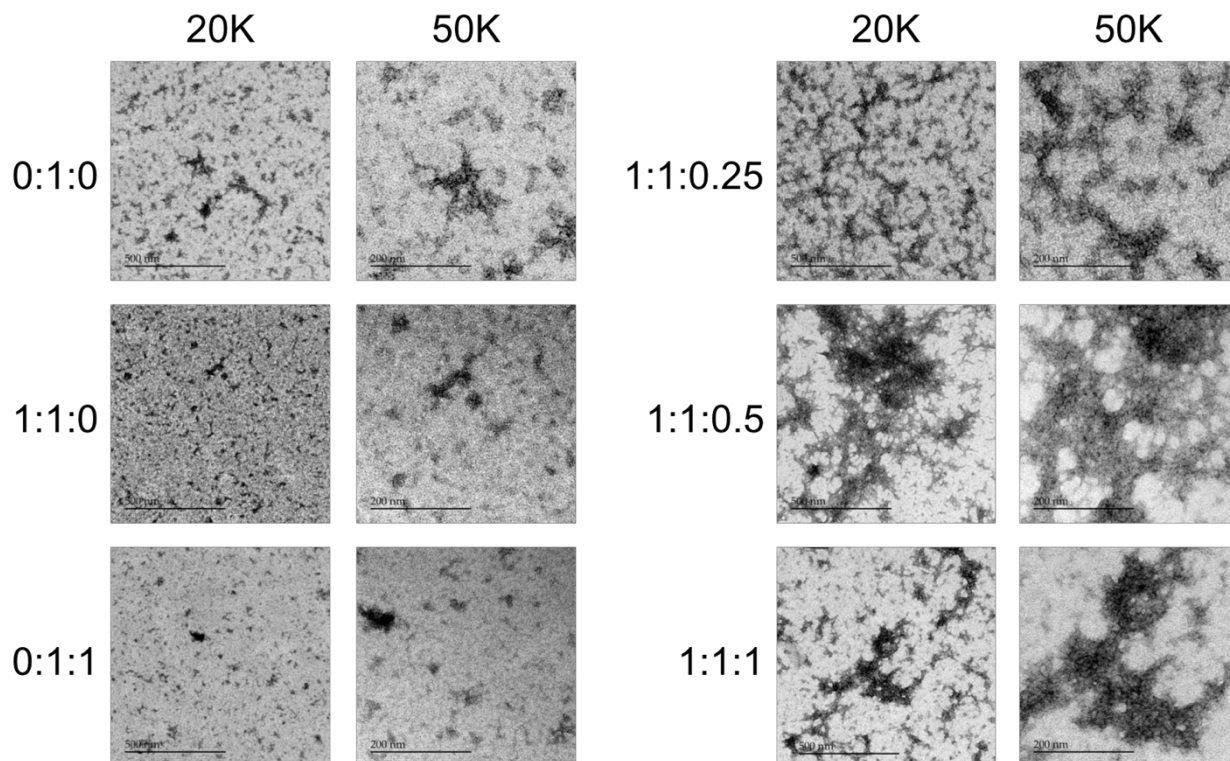


Figure 28. Transmission electron microscopy images of pressure treated samples at various ratios of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin and beta-casein at magnification factors of 20 and 50K.

#### 6.5.4 Composition of pressure-induced aggregates

To test our second hypothesis that if  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN were part of the aggregates, the composition of aggregates was analyzed. Different fractions of protein aggregates were recovered after HPSEC separations as shown in Figures 29B and 30B. Although SDS-PAGE did not show inhibition of aggregation when  $\beta$ -lg was pressurized with both  $\alpha$ -la and  $\beta$ -CN, possible interactions between  $\beta$ -lg and  $\beta$ -CN have been determined. The compositions of pressure-induced aggregates of 0:1:1 and 1:1:1 were characterized using HPSEC and reduced SDS-PAGE analyses on pressure-treated solutions (Figs. 29 and 31).

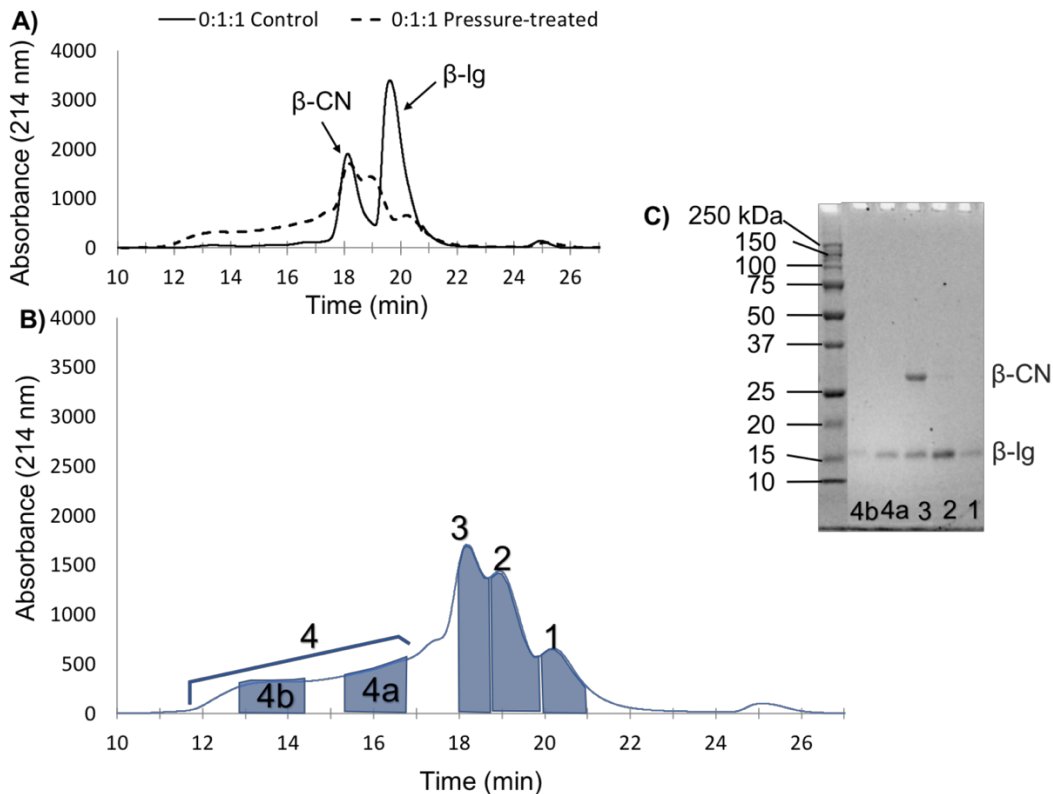


Figure 29. HPSEC profile of control and pressure treated (A and B) solutions and composition of aggregates generated by HHP of solutions (C) containing beta-lactoglobulin and beta-casein (0:1:1) determined by SDS-PAGE under reducing conditions.

Figure 29 A shows the effect of pressurization in a solution of  $\beta$ -lg and  $\beta$ -CN. The intensity of the peak corresponding to  $\beta$ -lg decreased drastically after pressure treatment confirming that  $\beta$ -lg lost its native structure and formed aggregates. The  $\beta$ -CN peak, however, was not affected by HHP treatment. To determine the composition of each aggregate and, therefore, discover whether  $\beta$ -CN interacted with  $\beta$ -lg under HHP, five fractions corresponding to the peaks (1-4), as shown in Figure 29 B, were collected from HPSEC. The collected fractions, 1  $\approx$  24.5 kDa, 2  $\approx$  47.5 kDa, 3  $\approx$  79 kDa, 4a  $\approx$  220 kDa, and 4b  $>$  650 kDa were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 29 C). According to the band intensities,  $\beta$ -lg was found mostly in fraction 2 which corresponds to dimers of  $\beta$ -lg. This observation was identical when  $\beta$ -lg was pressurized alone (0:1:0 – data not shown).  $\beta$ -lg was the only protein detected in the larger aggregates (fractions 4a and b),

suggesting no interactions between  $\beta$ -lg and  $\beta$ -CN. The  $\beta$ -CN protein was only found in lane 3 (fraction 3). Obviously, the real molecular weight of  $\beta$ -CN (24 kDa) does not correspond to this value, however, the retention time for control and pressure-treated  $\beta$ -CN is exactly the same. This confirms that the HHP treatment does not affect  $\beta$ -CN. Furthermore, the presence of  $\beta$ -lg in this fraction (Fig. 29 C) is due to the formation of aggregates of  $\beta$ -lg having a similar hydrodynamic volume as  $\beta$ -CN or due the low peak resolution.

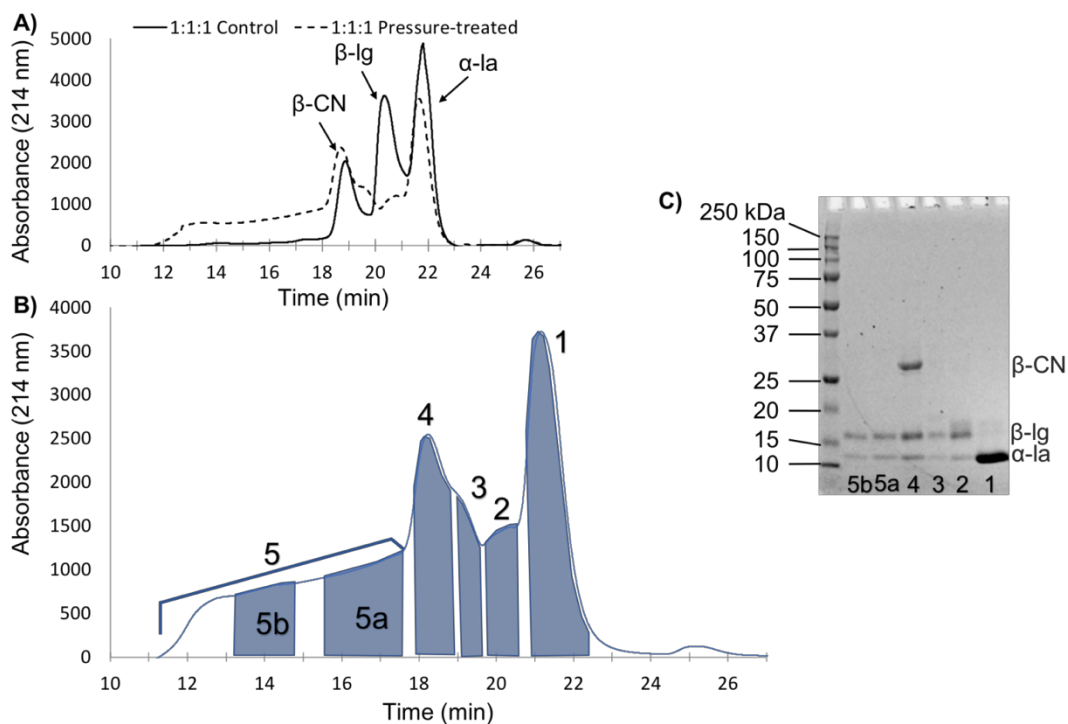


Figure 30. HPSEC profile of control and pressure treated (A and B) solutions and composition of aggregates generated by HHP of the solutions (C) containing alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and beta-casein (1:1:1), determined by SDS-PAGE under reducing conditions.

For the sample containing the three proteins (1:1:1), a small decrease in the native  $\alpha$ -la peak (Fig. 30 A) was observed, suggesting that HHP might cause this protein to self-aggregate or aggregate with other proteins, whereas the intensity of the native  $\beta$ -lg peak decreased drastically,

and  $\beta$ -CN seemed unaffected. Six fractions were collected from the pressure-treated solution, representing peaks 1 to 5b (Fig. 30 B). These fractions correspond to: 1  $\approx$  14.8 kDa, 2  $\approx$  24.5 kDa, 3  $\approx$  37 kDa, 4  $\approx$  71.5 kDa, 5a  $\approx$  150 kDa and 5b  $>$  650 kDa. A small amount of  $\alpha$ -la was observed in all fractions (1 to 5b), confirming the interaction of  $\alpha$ -la with  $\beta$ -lg (Fig. 30 C). In agreement with results of Patel *et al.*, (2006), Huppertz, Fox, *et al.*, (2004b) and Marciniak *et al.*, (2018),  $\alpha$ -la, which contains four disulfide bonds, can interact with  $\beta$ -lg through a sulfhydryl-disulfide interchange reaction, even at pressures below 800 MPa. Nevertheless, the majority of  $\alpha$ -la remained in its monomeric form (Fig. 30 C - lane 1). Beta-lactoglobulin was found in all fractions from 2 to 5b, corresponding to dimers and larger aggregates. These results confirm its interaction with  $\alpha$ -la to form large aggregates (Fig. 30 C - lanes 5b and 5a). As observed in Figure 28,  $\beta$ -CN was only detected in one fraction (Fig. 30 C - lane 4), suggesting no interaction with other proteins even if  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -la were identified in this fraction.

Our analysis of pressure-treated solutions by HPSEC and characterization of aggregates by SDS-PAGE do not suggest any interaction between  $\beta$ -CN and  $\beta$ -lg under HHP. The lack of free thiol residues in  $\beta$ -CN results in the absence of tertiary and quaternary structure and no interaction with other proteins. Even though experiments and analyses were carried out at room temperature, it is possible that hydrophobic interactions were not observed due to their sensitivity to temperature.

## 6.6 Conclusion

So far, in contrast to the conclusions of other authors investigating the chaperone-like effect of  $\beta$ -CN on  $\beta$ -lg during thermal treatment, we did not observe this effect under HHP treatment, especially in the presence of other whey proteins such as  $\alpha$ -la. The single or binary mixture of  $\beta$ -lg with  $\beta$ -CN or  $\alpha$ -la formed globular aggregates responsible for higher turbidity. However, the mixture of all of these proteins led to the formation of completely new types of soluble amorphous aggregates that were not previously observed with HHP treatment. This study provides the first experimental evidence of an indirect relationship between pressure-induced aggregation and turbidity. Our results show that  $\beta$ -CN has a real impact on  $\beta$ -lg aggregation, but

this is a complex effect in the presence of  $\alpha$ -la. Moreover, since inhibition of  $\beta$ -lg aggregation is important to applications such as food processing and dairy ingredient formulation, it is crucial to analyze the chaperone-like effect in heterogenous mixtures containing more than two proteins since  $\alpha$ -la had an effect on the shape and structure of aggregates formed. Our results confirm the absence of the  $\beta$ -CN in the aggregates formed by  $\beta$ -lg, as required for a molecular-chaperone protein. However, we cannot yet conclude that  $\beta$ -CN has a chaperone-like effect on pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lg, especially in the presence of  $\alpha$ -la.

## 6.7 Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## 6.8 Acknowledgments

The authors thanks Ms. Diane Gagnon (Food Science Department, Université Laval) for technical support and Mr. Richard Janvier (Institute for Integrative Systems Biology (IBIS), Université Laval) for help with and advice on TEM analysis. We also acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for the financial support of this project and Agropur Ingredients (La Crosse, WI) for providing whey protein powders.

## 6.9 References

- Bhattacharyya, J., & Das, K. P. (1999). Molecular chaperone-like properties of an unfolded protein,  $\alpha$ s-casein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15505-15509.
- Boland, M., Singh, H., & Thompson, A. (2014). *Milk Proteins: From Expression to Food* (2 ed.): Elsevier Science.
- Bravo, F. I., Felipe, X., Lopez-Fandino, R., & Molina, E. (2013). High-pressure treatment of milk in industrial and pilot-scale equipments: effect of the treatment conditions on the protein

distribution in different milk fractions. *European Food Research and Technology*, 236(3), 499-506.

Bravo, F. I., Felipe, X., Lopez-Fandino, R., & Molina, E. (2015). Skim Milk Protein Distribution As A Result Of Very High Hydrostatic Pressure. *Food Research International*, 72, 74-79.

Considine, T., Patel, H. A., Anema, S. G., Singh, H., & Creamer, L. K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments—a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 1-23.

Dickinson, E., Murray, B. S., & Pawlowsky, K. (1997). On the effect of high-pressure treatment on the surface activity of  $\beta$ -casein. *Food Hydrocolloids*, 11(4), 507-509.

Farrell, H., Malin, E., Brown, E., & Qi, P. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2), 135-147.

Gaucheron, F., Famelart, M. H., Mariette, F., Raulot, K., Michela, F., & Le Graeta, Y. (1997). Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chemistry*, 59(3), 439-447.

Hall, D., Zhao, R., Dehlsen, I., Bloomfield, N., Williams, S. R., Arisaka, F., Goto, Y., & Carver, J. A. (2016). Protein aggregate turbidity: Simulation of turbidity profiles for mixed-aggregation reactions. *Analytical biochemistry*, 498, 78-94.

Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324.

He, J.-S., Zhu, S., Mu, T.-H., Yu, Y., Li, J., & Azuma, N. (2011).  $\alpha$  s-casein inhibits the pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin through its molecular chaperone-like properties. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1581-1586.

Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2004). High pressure-induced denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research*, 71(04), 489-495.



- Jouan, P. (2002). Lactoprotéines et lactopeptides: Propriétés biologiques: Quae.
- Kehoe, J., & Foegeding, E. (2010). Interaction between  $\beta$ -casein and whey proteins as a function of pH and salt concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 349-355.
- Kehoe, J., & Foegeding, E. (2014). The characteristics of heat-induced aggregates formed by mixtures of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein. *Food Hydrocolloids*, 39, 264-271.
- Marciniak, A., Suwal, S., Britten, M., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2018). The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of an alpha-lactalbumin enriched-fraction. *Green Chemistry*, 20(2), 515-524.
- Mazri, C., Sanchez, L., Ramos, S. J., Calvo, M., & Perez, M. D. (2012). Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. *European Food Research and Technology*, 234(5), 813-819.
- O'Kennedy, B. T., & Mounsey, J. S. (2006). Control of heat-induced aggregation of whey proteins using casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5637-5642.
- Patel, H. a., Singh, H., Anema, S. G., & Creamer, L. K. (2006). Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3409-3420.
- Yong, Y. H., & Foegeding, E. A. (2008). Effects of Caseins on Thermal Stability of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10352-10358.
- Yong, Y. H., & Foegeding, E. A. (2010). Caseins: Utilizing Molecular Chaperone Properties to Control Protein Aggregation in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 685-693.
- Yousefi, R., Shchutskaya, Y. Y., Zimny, J., Gaudin, J. C., Moosavi-Movahedi, A. A., Muronetz, V. I., Zuev, Y.F., Chobert, J. M., & Haertle, T. (2009). Chaperone-like activities of different molecular forms of  $\beta$ -casein. Importance of polarity of N-terminal hydrophilic domain. *Biopolymers*, 91(8), 623-632.

Zhang, X., Fu, X., Zhang, H., Liu, C., Jiao, W., & Chang, Z. (2005). Chaperone-like activity of  $\beta$ -casein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(6), 1232-1240.

Zhao, R., So, M., Maat, H., Ray, N. J., Arisaka, F., Goto, Y., Carver, J. A., & Hall, D. (2016). Measurement of amyloid formation by turbidity assay—seeing through the cloud. *Biophysical reviews*, 1-27.

## 7 Conclusion Générale

### 7.1 Principaux résultats

Afin de valoriser le lactosérum par la production de protéines à haute valeur ajoutée, cette thèse avait pour but de *développer un procédé industriel innovant et eco-efficient pour le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg par l'utilisation des HPH et d'un ligand : les CN, pour obtenir une fraction enrichie en  $\alpha$ -la par simple acidification*

L'hypothèse sur laquelle s'est basée l'ensemble des travaux était que *la différence de barosensibilité des protéines sériques soumises au HPH permet de moduler spécifiquement des interactions protéines-protéines permettant ainsi d'améliorer le fractionnement d'un mélange protéique modèle par simple acidification subséquente*

Pour vérifier cette hypothèse, différents paramètres de pressurisation (temps et niveau de pressurisation) ainsi que le type et la concentration de CN (utilisée comme ligand) ont été étudiés. Finalement le rôle de la  $\beta$ -CN comme potentielle protéine chaperonne vis-à-vis de l'agrégation de la  $\beta$ -lg par les HPH a été évalué. Pour les deux premiers objectifs, l'impact des paramètres étudiés a été mesuré sur le taux de purification et le rendement de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg. Alors que dans le troisième objectif, l'impact de la présence de la  $\beta$ -CN a été mesuré qualitativement, sur la turbidité des solutions et la forme et composition des agrégats générés par HPH.

Chaque chapitre de résultats a pu répondre à des objectifs bien définis, tels que détaillés au Chapitre 3. De ce fait, les Chapitre 4, 5 et 6, répondent respectivement aux objectifs suivants : 1) *Étudier les paramètres de pressurisation (temps et pression) et du type de CN (CI ou CM) sur un mélange modèle d' $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg et CN*, 2) *Évaluer le potentiel concentration-dépendant des CN en tant que ligand dans le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg* et 3) *Étudier l'activité chaperonne de la  $\beta$ -CN sur l'agrégation de la  $\beta$ -lg sous HPH en présence d' $\alpha$ -la.*

Les principaux résultats sont présentés ici suivant les objectifs décrits au Chapitre 3.

**Objectif 1 :**

- Les HPH couplées à l'utilisation d'un ligand (CN) et à l'acidification à pH 4,6 permettent le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg.
- Le temps de pressurisation ainsi que le niveau de pressurisation ont un impact significatif sur le taux de purification de l' $\alpha$ -la.
- Le type de CN utilisé (isoélectrique ou micellaire) comme ligand, n'impacte pas la pureté de la fraction enrichie en  $\alpha$ -la.
- Les paramètres 600 MPa – 300 s avec HCl permettent d'obtenir les taux de purification et rendement en  $\alpha$ -la les plus élevés.

**Objectif 2 :**

- La concentration en CN joue un rôle important sur la purification de l' $\alpha$ -la.
- Pour des concentrations inférieures à 3,125 mg.mL<sup>-1</sup>, l'utilisation des CN n'affecte pas et n'améliore pas le fractionnement de l' $\alpha$ -la.
- Pour des concentrations supérieures à 3,125 mg.mL<sup>-1</sup>, l'utilisation de CN engendre une diminution significative du taux de purification de l' $\alpha$ -la par la diminution de l'agrégation de la  $\beta$ -lg.
- Les CN à concentration élevée, pourrait avoir une activité chaperonne sur l'agrégation de la  $\beta$ -lg sous HPH.

### **Objectif 3 :**

- La présence de  $\beta$ -CN entraîne une diminution de la turbidité des solutions sériques pressurisées, proportionnelle à la concentration de  $\beta$ -CN.
- La turbidité n'est pas linéairement proportionnelle à l'agrégation des protéines, mais dépend aussi de la forme des agrégats.
- Les agrégats globulaires de  $\beta$ -lg changent en agrégats amorphes de plus grosse taille en présence d' $\alpha$ -la et  $\beta$ -CN entraînant une diminution de la turbidité des solutions.
- La  $\beta$ -CN n'est pas présente dans les agrégats amorphes ou globulaires induits par HPH, c'est une caractéristique propre aux protéines chaperonnes.

## **7.2 Contribution originale de la thèse**

La valorisation des coproduits de l'industrie laitière demeure un défi majeur d'un point de vue économique et environnemental. Le lactosérum, coproduit majeur de cette industrie, regorge de molécules à haute valeur telles que les protéines. Cependant leur valeur est d'autant plus importante lorsque celles-ci sont sous une forme purifiée. La plupart des études portant sur le fractionnement de l' $\alpha$ -la et la  $\beta$ -lg disponibles dans la littérature utilisent des procédés conventionnels non adaptés à ce type de mélange protéique de poids moléculaires similaires, ou bien, peu utilisés à l'échelle industrielle, ou finalement présentant un impact environnemental non négligeable. Dans ce contexte, le développement d'une nouvelle technologie verte, applicable à l'échelle industrielle, et efficace sur des mélanges protéiques de poids moléculaires similaires, telle que développée dans ces travaux de thèse, peut s'avérer très prometteur et avantageux pour l'industrie.

La démarche entreprise dans cette étude a permis de démontrer que le procédé de HPH peut être utilisé pour moduler des interactions protéiques spécifiques pour le fractionnement de l' $\alpha$ -la et de la  $\beta$ -lg. Suite aux expérimentations menées, les paramètres optimaux permettant d'obtenir une fraction enrichie en  $\alpha$ -la ont été déterminés. En effet, un traitement de 600 MPa pendant 300 s

(similaire à un cycle de pasteurisation à froid appliqué en industrie) et une acidification à pH 4,6, des protéines sériques seules permet un fractionnement optimal de l' $\alpha$ -la avec un taux de pureté de près de 79 % et un rendement en  $\alpha$ -la de 88 %. De plus, l'étude a démontré que l'utilisation de CN comme ligand ne permettait pas d'améliorer le fractionnement de l' $\alpha$ -la, voire entraînait une diminution de l'agrégation de la  $\beta$ -lg (à concentration élevée) et donc du taux de purification de l' $\alpha$ -la. Ces résultats suggéraient donc un effet chaperon des CN sur l'agrégation par les HPH de la  $\beta$ -lg. L'approche originale proposée a permis de démontrer que la présence de la  $\beta$ -CN et de l' $\alpha$ -la permettait de générer des agrégats solubles de  $\beta$ -lg, en comparaison à la  $\beta$ -lg pressurisée seule et/ou avec l' $\alpha$ -la mettant ainsi en avant une relation non linéaire entre agrégation protéique et turbidité. À notre connaissance, aucune autre étude n'a apporté de résultats si approfondis sur cet aspect.

### 7.3 Perspectives

Le procédé développé dans le cadre de ce projet de doctorat a certes fait ses preuves sur des solutions modèles, néanmoins, il pourrait bénéficier de plusieurs travaux additionnels afin d'en optimiser les paramètres pour son application industrielle. Il serait alors judicieux de tout d'abord étudier l'application de ce procédé de fractionnement par les HPH, sur des solutions complexes telles que le lactosérum de fromagerie et ainsi adapter les paramètres optimaux à la matrice utilisée (lactosérums concentré, acide, etc.).

Ce projet innovant, basé sur les HPH a permis 1) de séparer l' $\alpha$ -la de la  $\beta$ -lg, générant ainsi par simple acidification, un surnageant (riche en  $\alpha$ -la  $\approx$  79 %) et un culot (riche en  $\beta$ -lg  $\approx$  87 %) et 2) générer des agrégats solubles d' $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg et  $\beta$ -CN. Les voies de valorisation de la fraction enrichie en  $\alpha$ -la sont nombreuses, puisque celle-ci, peu impactée par les HPH, peut être utilisée notamment dans les formulations infantiles. Dans le cas de la fraction enrichie en  $\beta$ -lg et des agrégats solubles, la priorité serait la caractérisation des propriétés techno-fonctionnelles, nutritionnelles ainsi que la digestibilité (*in vitro* et *in vivo*). Après caractérisation de la fraction enrichie en  $\beta$ -lg, et suite aux résultats originaux présentés dans ce manuscrit, trois applications principales sont proposées.

### **7.3.1 Application pour la production de protéines purifiées à haute valeur**

L'obtention de protéines pures et fonctionnelles est d'intérêt majeur dans l'industrie laitière. Généralement, ces protéines sont obtenues suite à des traitements conventionnels (filtration membranaire et chromatographie) qui sont longs et présentent un impact environnemental considérable. De ce fait, l'utilisation d'une technologie simple, rapide et verte est une solution prometteuse dans ce domaine. De plus, il a déjà été démontré que des traitements thermiques, dans des conditions précises, pouvaient améliorer la fonctionnalité des protéines. Ainsi, les HPH couplées à une acidification, qui permettent d'obtenir une fraction enrichie en  $\beta$ -lg (culot  $\approx$  87 %), pourraient avoir amélioré les propriétés techno-fonctionnelles de la  $\beta$ -lg.

### **7.3.2 Application pour les boissons enrichie en protéines**

L'utilisation des HPH pour la production de solutions protéiques ( $\alpha$ -la,  $\beta$ -lg et  $\beta$ -CN) non turbides est une propriété largement recherchée dans l'industrie des boissons sportives enrichies en protéines. En effet, divers produits commerciaux de ce type émergent, vantant ainsi des solutions limpides à haute teneur protéique. Généralement, ces produits sont obtenus suite à l'application d'un traitement thermique. Dans ce contexte, l'utilisation de la  $\beta$ -CN et des HPH pour la production de boissons sportives limpides enrichies en protéines de lactosérum ( $\alpha$ -la et  $\beta$ -lg) semble une alternative prometteuse dans ce secteur. Pour cela, l'effet des différents composants d'une boisson type tels que la concentration en protéines et sels, le pH, et la viscosité ainsi que des conditions de stockage (température et durée) doit être étudié plus en profondeur.

### **7.3.3 Application pour la production fromagère**

Finalement, il est bien connu que l'ajout de concentrés de protéines de lactosérum dénaturées (CPLD) permet d'améliorer les rendements fromagers ainsi que la rétention d'eau et de protéines. Dans ce contexte, les agrégats insolubles de  $\beta$ -lg générés par les HPH après séparation par acidification de l' $\alpha$ -la, pourrait être incorporés dans des matrices fromagères, et leur impact (taille des agrégats, etc) pourrait être étudié sur les différents paramètres de production.

## 8 Références

- Akbari, Bamdad, & Wu. (2018). Chaperone-like food components: from basic concepts to food applications. *Food & function*.
- Almécija, Ibáñez, Guadix, & Guadix. (2007). Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. *Journal of Membrane Science*, 288(1), 28-35.
- Alomirah, & Alli. (2004). Separation and characterization of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin from whey and whey protein preparations. *International Dairy Journal*, 14(5), 411-419.
- Altuner, Alpas, Erdem, & Bozoglu. (2006). Effect of high hydrostatic pressure on physicochemical and biochemical properties of milk. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 392-396.
- Aouzelleg. (2014). High pressure control of protein structure and functionality. *Nutrition & Food Science*, 44(1), 41-46.
- Arunkumar, & Etzel. (2013). Fractionation of  $\alpha$ -lactalbumin from  $\beta$ -lactoglobulin using positively charged tangential flow ultrafiltration membranes. *Separation and Purification Technology*, 105, 121-128.
- Atuonwu, & Tassou. (2018). Model-based energy performance analysis of high pressure processing systems. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 47, 214-224.
- Balasubramaniam, Barbosa-Cánovas, & Lelieveld. (2016). *High Pressure Processing of Food: Principles, Technology and Applications*: Springer.
- Bansal, & Bhandari. (2016). Functional Milk Proteins: Production and Utilization—Whey-Based Ingredients. In Mcsweeney & O'mahony (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects* (pp. 67-98). New York, NY: Springer New York.
- Barbana, Pérez, Sánchez, Dalgalarroondo, Chobert, Haertlé, & Calvo. (2006). Interaction of bovine  $\alpha$ -lactalbumin with fatty acids as determined by partition equilibrium and fluorescence spectroscopy. *International Dairy Journal*, 16(1), 18-25.
- Barbosa-Cánovas, & Lelieveld. (2016). High Pressure Processing of Food: Principles, Technology and Applications. In: Springer.
- Bhattacharyya, & Das. (1999). Molecular chaperone-like properties of an unfolded protein,  $\alpha$ -casein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15505-15509.
- Blomkalns, & Gomez. (1997). *Purification of Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (Vol. 27).
- Boland, Singh, & Thompson. (2014). *Milk Proteins: From Expression to Food* (2 ed.): Elsevier Science.
- Braunitzer, Chen, Schrank, & Stangl. (1973). Die sequenzanalyse des  $\beta$ -lactoglobulins. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 354(2), 867-878.



- Bravo, Felipe, Lopez-Fandino, & Molina. (2013). High-pressure treatment of milk in industrial and pilot-scale equipments: effect of the treatment conditions on the protein distribution in different milk fractions. *European Food Research and Technology*, 236(3), 499-506.
- Bravo, Felipe, Lopez-Fandino, & Molina. (2015). Skim Milk Protein Distribution As A Result Of Very High Hydrostatic Pressure. *Food Research International*, 72, 74-79.
- Brew, Castellino, Vanaman, & Hill. (1970). The complete amino acid sequence of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry*, 245(17), 4570-4582.
- Bridgman. (1912). *Water, in the liquid and five solid forms, under pressure*. Paper presented at the Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences.
- Brignon, Ribadeau-Dumas, Mercier, Pelissier, & Das. (1977). Complete amino acid sequence of bovine  $\alpha$ 2-casein. *FEBS letters*, 76(2), 274-279.
- Brulé, Lenoir, & Remeuf. (1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait. *Le Fromage, Lavoisier Tec & Doc, Paris*, 7-41.
- Bylund. (2015). *Dairy processing handbook* (3 ed.). Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Cadesky, Walkling-Ribeiro, Kriner, Karwe, & Moraru. (2017). Structural changes induced by high-pressure processing in micellar casein and milk protein concentrates. *Journal of dairy science*, 100(9), 7055-7070.
- Chawla, Patil, & Singh. (2011). High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *Journal of food science and technology*, 48(3), 260-268.
- Cheang, & Zydney. (2003). Separation of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin using membrane ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 201-209.
- Cheang, & Zydney. (2004). A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *Journal of Membrane Science*, 231, 159-167.
- Coffey, Fenton, O'mahony, & Henry. (2012). *Purification and applications of bacteriophage lytic enzymes*.
- Considine, Patel, Anema, Singh, & Creamer. (2007a). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments : A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 1-23.
- Considine, Patel, Anema, Singh, & Creamer. (2007b). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments—a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 1-23.
- Croguennec, Jeantet, & Brulé. (2008). *Fondements physicochimiques de la technologie laitière* (Tec & Doc ed.): Tec & Doc.

- Dalgleish, & Corredig. (2012). The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annual review of food science and technology*, 3(1), 449-467.
- De Boer. (2014). *From milk by-products to milk ingredients: upgrading the cycle*: John Wiley & Sons.
- De Kruif, & Holt. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (pp. 233-276): Springer.
- De Kruif, Huppertz, Urban, & Petukhov. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in colloid and interface science*, 171, 36-52.
- Desilva, Stockmann, & Smithers. (2003). Isolation procedures for functional dairy components—novel approaches to meeting the challenges. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(2), 148.
- Dias, Ala-Nissila, Wong-Ekkabut, Vattulainen, Grant, & Karttunen. (2010). The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. *Cryobiology*, 60(1), 91-99.
- Dickinson, Murray, & Pawlowsky. (1997). On the effect of high-pressure treatment on the surface activity of  $\beta$ -casein. *Food Hydrocolloids*, 11(4), 507-509.
- Dickinson, & Parkinson. (2004). Heat-induced aggregation of milk protein-stabilized emulsions: sensitivity to processing and composition. *International Dairy Journal*, 14(7), 635-645.
- Doultani, Turhan, & Etzel. (2004). Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. *Process Biochemistry*, 39(11), 1737-1743.
- Dumetz, Chockla, Kaler, & Lenhoff. (2008). Effects of pH on protein–protein interactions and implications for protein phase behavior. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1784(4), 600-610.
- Dzwolak, Kato, Shimizu, & Taniguchi. (1999). Fourier-transform infrared spectroscopy study of the pressure-induced changes in the structure of the bovine  $\alpha$ -lactalbumin: the stabilizing role of the calcium ion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1433(1), 45-55.
- El-Sayed, & Chase. (2011). Trends in whey protein fractionation. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1501-1511.
- Ellis. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 328, 378.
- Etzel. (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 996S-1002S.
- Farrell, Jimenez-Flores, Bleck, Brown, Butler, Creamer, Hicks, Hollar, Ng-Kwai-Hang, & Swaisgood. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk - Sixth Revision. *Journal of dairy science*, 87(6), 1641-1674.

- Farrell, Malin, Brown, & Qi. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2), 135-147.
- Farrell, Qi, Brown, Cooke, Tunick, Wickham, & Unruh. (2002). *Molten Globule Structures in Milk Proteins: Implications for Potential New Structure-Function Relationships* (Vol. 85).
- Fox, & Mulvihill. (1982). Milk proteins: molecular, colloidal and functional properties. *Journal of Dairy Research*, 49(04), 679-693.
- Funtenerger, Dumay, & Cheftel. (1995). Pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *LWT - Food Science and Technology*, 28(4), 410-418.
- Funtenerger, Dumay, & Cheftel. (1997a). High pressure promotes  $\beta$ -lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 912-921.
- Funtenerger, Dumay, & Cheftel. (1997b). High pressure promotes  $\beta$ -lactoglobulin aggregation through SH/SS interchange reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 912-921.
- Gaucheron. (2004). *Minéraux et produits laitiers: Technique & Documentation*.
- Gaucheron. (2011). Milk Salts: Distribution and analysis. In *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. np): Academic Press.
- Gaucheron, Famelart, Mariette, Raulot, Michela, & Le Graeta. (1997). Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chemistry*, 59(3), 439-447.
- Gebhardt, Doster, Friedrich, & Kulozik. (2006). Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. *European Biophysics Journal*, 35(6), 503-509.
- Geng, Tolkach, Otte, & Ipsen. (2015). Pilot-scale purification of  $\alpha$ -lactalbumin from enriched whey protein concentrate by anion-exchange chromatography and ultrafiltration. *Dairy Science & Technology*, 95(3), 353-368.
- Gerberding, & Byers. (1998). Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *Journal of Chromatography A*, 808(1), 141-151.
- . Global High Pressure Processing Market: Trends Analysis & Forecasts to 2021. (2016). *Cision PRNewswire*.
- Goodall, Grandison, Jauregi, & Price. (2008). Selective separation of the major whey proteins using ion exchange membranes. *Journal of dairy science*, 91(1), 1-10.
- Grinberg, & Haertlé. (2000). Reducer driven baric denaturation and oligomerisation of whey proteins. *Journal of biotechnology*, 79(3), 205-209.

- Gurgel, Carbonell, & Swaisgood. (2000). Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin. *Bioseparation*, 9(6), 385-392.
- Guyomarc'h, Nono, Nicolai, & Durand. (2009). Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of  $\kappa$ -casein or sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1103-1110.
- Hall, Zhao, Dehlsen, Bloomfield, Williams, Arisaka, Goto, & Carver. (2016). Protein aggregate turbidity: Simulation of turbidity profiles for mixed-aggregation reactions. *Analytical biochemistry*, 498, 78-94.
- Harte, Gurram, Luedecke, Swanson, & Barbosa-Cañovas. (2007). Effect of high hydrostatic pressure and whey proteins on the disruption of casein micelle isolates. *Journal of Dairy Research*, 74(04), 452-458.
- Hartl, Bracher, & Hayer-Hartl. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324.
- He, Zhu, Mu, Yu, Li, & Azuma. (2011).  $\alpha$  s-casein inhibits the pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin through its molecular chaperone-like properties. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1581-1586.
- Heremans, & Smeller. (1998). Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1386(2), 353-370.
- Holland, Kackmar, & Corredig. (2012). Short communication: Isolation of a whey fraction rich in  $\alpha$ -lactalbumin from skim milk using tangential flow ultrafiltration. *Journal of dairy science*, 95(10), 5604-5607.
- Holt, Carver, Ecroyd, & Thorn. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of dairy science*, 96(10), 6127-6146.
- Horne. (1998). Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8(3), 171-177.
- Horne. (2002). Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5), 456-461.
- Horne. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2-3), 148-153.
- Hosseini-Nia, Ismail, & Kubow. (2002). Effect of High Hydrostatic Pressure on the Secondary Structures of BSA and Apo-and Holo- $\alpha$ -Lactalbumin Employing Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Food Science*, 67(4), 1341-1347.
- Huang, Hsiang-Mei, Yin-Hsuan, Binghuei Barry, & Chung-Yi. (2015). Inactivation of Pathogenic *Listeria monocytogenes* in Raw Milk by High Hydrostatic Pressure. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(2).

- Huppertz, & De Kruif. (2006). Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure: influence of milk serum composition and casein micelle concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5903-5909.
- Huppertz, & De Kruif. (2007). Disruption and reassociation of casein micelles during high pressure treatment: influence of whey proteins. *The Journal of dairy research*, 74(2), 194-197.
- Huppertz, Fox, De Kruif, & Kelly. (2006). High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764(3), 593-598.
- Huppertz, Fox, & Kelly. (2002). High pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *The Journal of dairy research*, 71(1), 97-106.
- Huppertz, Fox, & Kelly. (2004a). High pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *The Journal of dairy research*, 71(1), 97-106.
- Huppertz, Fox, & Kelly. (2004b). High pressure-induced denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research*, 71(04), 489-495.
- Huppertz, Gazi, Luyten, Nieuwenhuijse, Alting, & Schokker. (2017). Hydration of casein micelles and caseinates: Implications for casein micelle structure. *International Dairy Journal*, 74, 1-11.
- Huppertz, Kelly, & De Kruif. (2006). Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure. *Journal of Dairy Research*, 73(03), 294-298.
- Huppertz, Kelly, & Fox. (2004). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, 12, 561-572.
- Huppertz, Vasiljevic, Zisu, & Deeth. (2019). Chapter 8 - Novel Processing Technologies: Effects on Whey Protein Structure and Functionality. In Deeth & Bansal (Eds.), *Whey Proteins* (pp. 281-334): Academic Press.
- Hurt, & Barbano. (2010). Processing factors that influence casein and serum protein separation by microfiltration. *Journal of dairy science*, 93(10), 4928-4941.
- Jegouic, Grinberg, Guingant, & Haertle. (1997). Baric oligomerization in alpha-lactalbumin/beta-lactoglobulin mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 19-22.
- Jenness, & Walstra. (1984). *Dairy chemistry and physics*: Wiley.
- Jermann, Koutchma, Margas, Leadley, & Ros-Polski. (2015). Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 14-27.

- Jollès, Schoentgen, Alais, Fiat, & Jollès. (1972). Studies on the Primary Structure of Cow  $\kappa$ -Casein. -Structural Features of para- $\kappa$ -Casein; N-terminal sequence of  $\kappa$ -caseinoglycopeptide studied with a sequencer. *Helvetica chimica acta*, 55(8), 2872-2883.
- Jouan. (2002). *Lactoprotéines et lactopeptides: Propriétés biologiques: Quae*.
- Kahn, & Tonello. (1999). Les hautes pressions en agro-alimentaire. *Séance du jeudi 18 mars 1999*.
- Kamau, Cheison, Chen, Liu, & Lu. (2010). Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 197-212.
- Kamigaki, Ito, Nishino, & Miyazawa. (2018). Microstructural observation of casein micelles in milk by cryo-electron microscopy of vitreous sections (CEMOVIS). *Microscopy*, 67(3), 164-170.
- Kehoe, & Foegeding. (2010). Interaction between  $\beta$ -casein and whey proteins as a function of pH and salt concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 349-355.
- Kehoe, & Foegeding. (2014). The characteristics of heat-induced aggregates formed by mixtures of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein. *Food Hydrocolloids*, 39, 264-271.
- Kelly. (2019). Chapter 9 - Whey Protein Ingredient Applications. In Deeth & Bansal (Eds.), *Whey Proteins* (pp. 335-375): Academic Press.
- Kim, Hipp, Bracher, Hayer-Hartl, & Ulrich Hartl. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry*, 82, 323-355.
- Kinsella, & Morr. (1984). Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 21(3), 197-262.
- Knoerzer. (2016). Nonthermal and Innovative Food Processing Technologies. In *Reference Module in Food Science*: Elsevier.
- Knudsen, & Skibsted. (2010). High pressure effects on the structure of casein micelles in milk as studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chemistry*, 119(1), 202-208.
- Konigsberg. (1972). [13] Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. In *Methods in Enzymology* (Vol. 25, pp. 185-188): Academic Press.
- Konrad, & Kleinschmidt. (2008). A new method for isolation of native  $\alpha$ -lactalbumin from sweet whey. *International Dairy Journal*, 18(1), 47-54.
- Koudelka, Hoffmann, & Carver. (2009). Dephosphorylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Caseins and Its Effect on Chaperone Activity: A Structural and Functional Investigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5956-5964.

- Koutchma. (2014). *Adapting High Hydrostatic Pressure (HPP) for Food Processing Operations*: Elsevier Science.
- Kurpiewska, Biela, Loch, Świątek, Jachimska, & Lewiński. (2018). Investigation of high pressure effect on the structure and adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 387-393.
- Kuwajima. (1996). The molten globule state of alpha-lactalbumin. *The FASEB journal*, 10(1), 102-109.
- Laneuville. (2004). *Étude de l'interaction entre la  $\beta$ -lactoglobuline et le xanthane natif ou le xanthane traité aux hautes pressions hydrodynamiques*. (Ph.D.), Université Laval, Québec.
- Lerasle, Duranton, Simonin, Membré, Chéret, De Lamballerie, Guillou, & Federighi. (2012). Traitements par hautes pressions hydrostatiques des denrées alimentaires: état de l'art. *Revue Méd. Vét*, 163(12), 595-614.
- Liyanaarachchi, Ramchandran, & Vasiljevic. (2015). Controlling heat induced aggregation of whey proteins by casein inclusion in concentrated protein dispersions. *International Dairy Journal*, 44, 21-30.
- Liyanaarachchi, & Vasiljevic. (2018). Caseins and their interactions that modify heat aggregation of whey proteins in commercial dairy mixtures. *International Dairy Journal*, 83, 43-51.
- Mao, Zhang, Li, Zhao, Liu, Wang, Duan, Wang, & Liu. (2017). One-step method for the isolation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from cow's milk while preserving their antigenicity. *International Journal of Food Properties*, 20(4), 792-800.
- Marciniak, Suwal, Britten, Pouliot, & Doyen. (2018). The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of an alpha-lactalbumin enriched-fraction. *Green Chemistry*, 20(2), 515-524.
- Mazri, Sanchez, Ramos, Calvo, & Perez. (2012). Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. *European Food Research and Technology*, 234(5), 813-819.
- Mddec. (2018). Politique québécoise de gestion des matières résiduelles. Retrieved from <http://www.mddec.gouv.qc.ca/matieres/pgmr/index.htm>
- Meng, Bai, Gao, Li, & Chen. (2017). Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 219, 290-296.
- Mercier, Brignon, & Ribadeau-Dumas. (1973). Structure primaire de la caseine  $\kappa$ B bovine. *European Journal of Biochemistry*, 35(2), 222-235.
- Mercier, Grosclaude, & Ribadeau-Dumas. (1971). Structure primaire de la caséine  $\alpha_{s1}$  bovine. *European Journal of Biochemistry*, 23(1), 41-51.

- Møller, & Le Maire. (1993). Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18659-18672.
- Morgan, Treweek, Lindner, Price, & Carver. (2005). Casein Proteins as Molecular Chaperones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2670-2683.
- Muller, Chaufer, Merin, & Daufin. (2003). Purification of alpha-lactalbumin from a prepurified acid whey: Ultrafiltration or precipitation. *Le Lait*, 83(6), 439-451.
- Muntau, Leandro, Staudigl, Mayer, & Gersting. (2014). *Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators* (Vol. 37).
- Neyestani, Djalali, & Pezeshki. (2003). Isolation of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity. *Protein Expression and Purification*, 29(2), 202-208.
- Nigen. (2008). *Interactions et assemblages entre l'alpha lactalbumine et le lysosyme: mécanismes, structure et stabilité*. (Ph.D.), Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes,
- Nono Djamen. (2011). *Etude structurale et rhéologique des systèmes mixtes caséinates/carraghénanes*. Université du Maine,
- O'kenedy, & Mounsey. (2006). Control of heat-induced aggregation of whey proteins using casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5637-5642.
- O'mahony, & Fox. (2013). Milk proteins: Introduction and historical aspects. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 43-85): Springer.
- Orlien, Olsen, & Skibsted. (2007). In situ measurements of pH changes in  $\beta$ -lactoglobulin solutions under high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4422-4428.
- Patel, Singh, Anema, & Creamer. (2006). Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3409-3420.
- Paul, Mcsweeney, & Patrick. (2013). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*: Springer.
- Pereira, & Vicente. (2010). Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, 43(7), 1936-1943.
- Pizzano, Manzo, Adalgisa Nicolai, & Addeo. (2012). Occurrence of major whey proteins in the pH 4.6 insoluble protein fraction from UHT-treated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 8044-8050.



- Playne, Bennett, & Smithers. (2003). Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(3), 242-264.
- Prazeres, Carvalho, & Rivas. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.
- Qi. (2007). Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Le Lait*, 87(4-5), 363-383.
- Rastogi, Raghavarao, Balasubramaniam, Niranjana, & Knorr. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69-112.
- Ratté. (2013). *Interaction entre un peptide de B-lactoglobuline bovine (B-lg f1-8) et les protéines du lactosérum: Le cas de l'a-lactalbumine*. (M. Sc.), Université Laval, Québec.
- Ribadeau-Dumas, Brignon, Grosclaude, & Mercier. (1972). Structure primaire de la caséine  $\beta$  bovine. *European Journal of Biochemistry*, 25(3), 505-514.
- Rivalain, Roquain, & Demazeau. (2010). Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnology Advances*, 28(6), 659-672.
- Rodiles-Lopez, Arroyo-Maya, Jaramillo-Flores, Gutierrez-Lopez, Hernandez-Arana, Barbosa-Canovas, Niranjana, & Hernandez-Sanchez. (2010). Effects of high hydrostatic pressure on the structure of bovine alpha-lactalbumin. *Journal of dairy science*, 93(4), 1420-1428.
- Rodriguez-Gonzalez, Buckow, Koutchma, & Balasubramaniam. (2015). Energy requirements for alternative food processing technologies—principles, assumptions, and evaluation of efficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 536-554.
- Rollema, & Fox. (1992). Casein association and micelle formation. *Advanced dairy chemistry-1: Proteins*.(Ed. 2), 111-140.
- Salvi, De Los Rios, & Vendruscolo. (2005). Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(3), 492-499.
- Schmidt. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in dairy chemistry*, 1, 61-86.
- Smiddy, Martin, Kelly, De Kruif, & Huppertz. (2006). Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase. *Journal of dairy science*, 89(6), 1906-1914.
- Smithers. (2015). Whey-ing up the options—Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14.
- Tang, Pikal, & Taylor. (2002). The effect of temperature on hydrogen bonding in crystalline and amorphous phases in dihydropyridine calcium channel blockers. *Pharmaceutical research*, 19(4), 484-490.

- Taulier, & Chalikian. (2001). Characterization of pH-induced transitions of  $\beta$ -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies | Edited by C. R. Matthews. *Journal of Molecular Biology*, 314(4), 873-889.
- Thömmes, & Etzel. (2007). Alternatives to Chromatographic Separations. *Biotechnology Progress*, 23(1), 42-45.
- Toro-Sierra, Tolkach, & Kulozik. (2013). Fractionation of  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin from Whey Protein Isolate Using Selective Thermal Aggregation, an Optimized Membrane Separation Procedure and Resolubilization Techniques at Pilot Plant Scale. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 1032-1043.
- Van Oss, Good, & Chaudhury. (1986). Solubility of proteins. *Journal of protein chemistry*, 5(6), 385-405.
- Walstra. (1990). On the Stability of Casein Micelles. *Journal of dairy science*, 73(8), 1965-1979.
- Walstra. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9(3), 189-192.
- Wang, Huang, Hsu, & Yang. (2016). Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 527-540.
- Wang, Riedl, Somerville, Balasubramaniam, & Schwartz. (2011). Influence of high-pressure processing on the profile of polyglutamyl 5-methyltetrahydrofolate in selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8709-8717.
- Waugh. (1958). The Interactions of  $\alpha$  s- $\beta$ -and  $\kappa$ -Caseins in Micelle Formation. *Discussions of the Faraday Society*, 25, 186-192.
- Wijayanti, Brodkorb, Hogan, & Murphy. (2019). Chapter 6 - Thermal Denaturation, Aggregation, and Methods of Prevention. In Deeth & Bansal (Eds.), *Whey Proteins* (pp. 185-247): Academic Press.
- Yong, & Foegeding. (2008). Effects of Caseins on Thermal Stability of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10352-10358.
- Yong, & Foegeding. (2010). Caseins: Utilizing Molecular Chaperone Properties to Control Protein Aggregation in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 685-693.
- Yordanov, & Angelova. (2010). High pressure processing for foods preserving. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(3), 1940-1945.
- Yousefi, Shchutskaya, Zimny, Gaudin, Moosavi-Movahedi, Muronetz, Zuev, Chobert, & Haertle. (2009). Chaperone-like activities of different molecular forms of  $\beta$ -casein. Importance of polarity of N-terminal hydrophilic domain. *Biopolymers*, 91(8), 623-632.
- Yver, Bonnaillie, Yee, Mcaloon, & Tomasula. (2011). Fractionation of whey protein isolate with supercritical carbon dioxide—Process modeling and cost estimation. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 240-259.

- Yver, Bonnaillie, Yee, Mcaloon, & Tomasula. (2012). Fractionation of Whey Protein Isolate with Supercritical Carbon Dioxide—Process Modeling and Cost Estimation. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 240-259.
- Zhang, Fu, Zhang, Liu, Jiao, & Chang. (2005). Chaperone-like activity of  $\beta$ -casein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(6), 1232-1240.
- Zhang, Witham, & Alexov. (2011). On the role of electrostatics on protein-protein interactions. *Physical biology*, 8(3), 035001-035001.
- Zhao, So, Maat, Ray, Arisaka, Goto, Carver, & Hall. (2016). Measurement of amyloid formation by turbidity assay—seeing through the cloud. *Biophysical reviews*, 1-27.
- Zou, Habermann-Rottinghaus, & Murphy. (1998). Urea effects on protein stability: hydrogen bonding and the hydrophobic effect. *Proteins*, 31(2), 107.