



Modifications des propriétés physico-chimiques de la caséine micellaire en présence du peptide f1-8 généré par hydrolyse trypsique de la bêta-lactoglobuline

Mémoire

Raquel Silveira Porto Oliveira

Maîtrise en sciences des aliments
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Raquel Silveira Porto Oliveira, 2018

Modifications des propriétés physico-chimiques de la caséine micellaire en présence du peptide f1-8 généré par hydrolyse trypsique de la bêta-lactoglobuline

Mémoire

Raquel Silveira Porto Oliveira

Sous la direction de :

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

RÉSUMÉ

Le peptide f1-8 (Pf1-8) obtenu par hydrolyse trypsique de la β -lactoglobuline a démontré plusieurs caractéristiques d'intérêt. En effet, outre sa capacité d'auto-assemblage et son caractère hydrophobe, il fait partie d'un groupe de peptides (tels que les peptides f9-14, f15-40, f142-148 de la β -lactoglobuline) ayant la capacité de se lier à certaines protéines du lait et de modifier le profil de dénaturation thermique de la β -lactoglobuline, probablement par des interactions hydrophobes avec le noyau hydrophobe de la protéine. Les caséines (CN) représentent à elles seules près de 80% de la totalité des protéines de lait bovin. Leur acidification à pH 4,6 engendre des changements structurels majeurs dans la micelle qui précipite au voisinage du point isoélectrique. L'objectif de ce projet était d'étudier les changements des propriétés physicochimiques des CN micellaires en présence du peptide Pf1-8. Ce peptide a été produit par hydrolyse trypsique d'un isolat de protéines de lactosérum, isolé par ultrafiltration, concentré par osmose inverse et purifié par lavages successifs et par centrifugation (pureté de 91%). Différentes solutions modèles (pH 6,6) avec des ratio CN: Pf1-8 de 1: 1, 5: 1 et 10: 1 (concentrations respectives de 2,5: 2,5, 2,5: 0,5 et 2,5: 0,25 mg / mL) ont été testées. Pour chaque solution dont les pH variaient de 6,6 à 2,6, la solubilité de la CN, la taille et la potentielle interaction des protéines avec le Pf1-8 ont été déterminées par SEC-HPLC et SDS-PAGE. Aucune précipitation de la CN n'a été observée dans toute la plage de pH testée pour la solution à un ratio de 1: 1. Cependant, pour des échantillons à un ratio de 10: 1 et 5: 1 de CN: f1-8, une précipitation a été observée à pH 4,6. Les analyses par SDS-PAGE et SEC-HPLC ont démontré la formation d'agrégats impliquant le Pf1-8 et une ou plusieurs espèces caséiques pour tous les pHs testés, et une augmentation de la solubilité ainsi qu'une diminution de la taille des CN micellaires. Par conséquent, ces résultats démontrent que le peptide Pf1-8 est capable de modifier les propriétés physicochimiques de la CN, représentant ainsi un stabilisant potentiel des protéines dans les formulations laitières.

ABSTRACT

The peptide f1-8 (Pf1-8) obtained by tryptic hydrolysis of β -lactoglobulin has demonstrated several characteristics of interest. Indeed, in addition to its capacity for self-assembly and its hydrophobicity, it is part of a group of peptides (such as peptides f9-14, f15-40, f142-148 of β -lactoglobulin) having the ability to bind to some milk proteins (like β -lactoglobulin and α -lactalbumin) and change the thermal denaturation profile, probably by hydrophobic interactions with the hydrophobic core of β -lactoglobulin. Caseins (CNs) alone account for nearly 80% of the total bovine milk protein. Their acidification at pH 4.6 causes major structural changes in the micelle and are precipitated in the vicinity of isoelectric point. The goal of this project was to study the changes in the physicochemical properties of micellar CN in the presence of peptide Pf1-8. This peptide was produced by tryptic hydrolysis of a whey protein isolate, isolated by ultrafiltration, concentrated by reverse osmosis and water washed by centrifugation to purify (91% purity). Different model solutions (pH 6.6) with CN: Pf1-8 ratios of 1:1, 5:1 and 10:1 (respective concentrations of 2.5:2.5, 2.5:0.5, and 2.5:0.25 mg/mL) were tested. For each solution, the solubility of the CN, size by SEC-HPLC, and protein-interaction by SDS-PAGE were determined at various pHs ranging from 6.6 to 2.6. No CN precipitation was observed in the whole range of pH tested for the solution at 1:1 ratio. However, for samples at ratio 10:1 and 5:1 of CN:f1-8, the precipitation was observed at pH 4.6. Analyses by SDS-PAGE and SEC-HPLC demonstrated the formation of aggregates involving Pf1-8 and one or more CNs for all tested pHs, and increase in the solubility, and decrease in the size. Consequently, our results demonstrate that Pf1-8 peptide can modify the physicochemical properties of CN thus representing as a potential protein stabilizer in dairy formulations.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xii
Avant-propos.....	xiv
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de littérature	3
1. La bêta-lactoglobuline.....	3
1.1. Structure de la β -lg.....	3
1.2. Propriétés physico-chimiques	5
1.3. . Hydrolyse trypsique de la β -lg.....	7
2. Le peptide f1-8	9
2.1. Structure du peptide f1-8.....	9
2.2. Étapes de production du peptide f1-8	9
2.3. Effet du pH et de la concentration en Pf1-8 sur sa solubilisation	10
2.4. Effet de la concentration du Pf1-8 sur sa structure secondaire.....	12
2.5. Modèle d'auto-assemblage du Pf1-8	13
2.6. Interaction du Pf1-8 avec certains ligands	14
3. Les caséines du lait.....	15
3.1. Composition et propriétés	15
3.2. Les micelles de CN et leurs structures.....	17
3.3.1. L'hydrolyse enzymatique des micelles de CN.....	22
3.3.2. L'effet de la température	22
3.3.3. La modification de la force ionique.....	23
3.3.4. Ajout d'éthanol	23
Chapitre 2. Hypothèse et objectifs de recherche	26
1. Hypothèse de recherche	26
2. Objectifs	26
Chapitre 3. Modifications physicochimiques de la caseine micellaire apres interaction avec le peptide f1-8 genere apres hydrolyse trypSique de la beta-lactoglobuline	27
1. Résumé.....	29
2. Abstract	30

3. Introduction	31
4. Materials and methods	33
4.1. Production, isolation and purification of peptide.....	33
4.1.1. Hydrolysis of β -lg.....	33
4.1.2. Isolation of Pf1-8.....	33
4.1.3. Peptides profile by HPLC analysis.....	33
4.2. Production of CN micelles.....	34
4.3. Experimental Design.....	34
4.4. Analysis.....	35
4.5. Statistical analysis.....	37
5. Results	37
5.1. Peptides profiles of precipitate washed.....	37
5.2. Visual observation.....	39
5.3. Effect of Pf1-8 concentration on the particle size distribution and ζ -potential of CN micelles.....	40
5.4. Effect of the concentration of Pf1-8 and CN in the aggregates size obtained by SEC-HPLC.....	43
5.5. Protein profile.....	45
6. Discussion	46
7. Conclusion	48
8. Acknowledgements	48
Chapitre 4. Discussion et conclusion générale	49
Bibliographie	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Les différents variants génétiques de la β -lg et leurs variations d'un point de vue de la position des acides aminés. Adapté de Caroli et al.(2009).	4
Tableau 1.2. Séquences et propriétés biologiques des fractions peptidiques obtenues suite à l'hydrolyse trypsique de la β -lg.....	8
Tableau 2.1. Caractéristiques visuelles des solutions dans l'eau à différentes concentrations du peptide β -lg f1-8 en fonction du pH (Adapté de Guy et al. (2011).	11
Tableau 2.2. Caractéristiques structurelles du Pf1-8 en fonction du pH ^a . Adapté de Guy et al. (2011)	11
Tableau 3.1. Composition et caractéristiques physicochimiques des CN du lait de vache	15
Tableau 4.1. Ratio and concentration of protein solutions.	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structures primaire (a) et tridimensionnelle (b) de la β -lg (variant A).....	3
Figure 1.2 Représentation schématique de changement de la structure de la β -lg en fonction du pH (Pessen et al. 1985).....	6
Figure 1.3 Séquence du peptide β -lg f1-8, a) Jaune – Acides aminés apolaires; Bleu- Acides aminés polaires et Vert- Acides aminés chargés basique et b) structure du peptide Pf1-8 en trois dimensions (Adapté de Pouliot et al.(2009).	9
Figure 1.4. Étapes du processus de production du Pf1-8 selon la méthode de Pouliot et al. (2009). 10	
Figure 1.5. Conformation du Pf1-8 observée par DC à pH 10 en fonction de la concentration - Adapté de Guy et al. (2011).	12
Figure 1.6. Un modèle proposé pour l'auto-assemblage du Pf1-8. Adapté de Guy et al. (2011).	13
Figure 1.7. Micrographie électronique d'une micelle de CN individuelle, réalisée en utilisant la technique de la microscopie électronique à balayage à effet de champ par Dalgleish et al. (2004).	16
Figure 1.8. Représentation des structures tridimensionnelle de la α s-, β - et κ -CN. Adapté de Ortega-Requena and Rebouillat (2015)	16
Figure 1.9. Modèle de représentation de micelles de CN proposé par Waugh (1958). Adapté de De Kruif et al. (2012).	18
Figure 1.10. Représentation de la structure sous-micellaire Adapté de Horne (2006).....	19
.....	19
Figure 1.11. Modèle <i>nanoclusters</i> et la illustration de la liaison entre les α s ₂ et β -CN avec le phosphate de calcium pour former un pont et compléter la chaîne selon(Holt et al. 1998). Adapté de Horne (2006)	19
.....	19
Figure 1.12. Représentation de la structure à dualité des liens. Adapté de (Horne 1998).	21
Figure 1.13. Les influences sur la micelle de CN en trois étapes simplifiées par un acide (Adapté de Bylund et al. 2015).....	24
Figure 1.14. Représentation schématique du « remplacement » de la κ -CN par la pectine lors de l'abaissement du pH, et des micelles de CN « revêtues » de molécules de pectine adsorbées. (Adapté de Tromp et al. 2004).....	25
Figure 3.1. HPLC chromatograms of complete tryptic hydrolysate, CTH (a) and subsequent washing steps, first (b) second (c), third (d), fourth (e) and fifth (f).	38
Figure 3.2. Visual appearance of the solubility of micellar CN as a function of pH and Pf1-8 concentration (a: pure CN, b: pure Pf1-8, c-e: CN-Pf1-8 at ratio 10:1, 5:1 and 1:1, respectively).....	40
Figure 3.3. Effects of the concentration of Pf1-8 (ratios 1:1 to 10:1) on the particle size distribution of CN. Particle size distributions of pure Pf1-8 and CN were also given. Each bar represented the mean of triplicate readings. Values within rows with different letters are significantly different in LSD test (P < 0.05) at a given parameter.	41

Figure 3.4. Effects of the concentration of peptide on the zeta-potential of CN. Each point represented the mean of triplicate readings. Values within rows with different letters are significantly different in LSD test ($P < 0.05$) at a given parameter..... 42

Figure 3.5. Molecular weight profiles of CN: Pf1-8 solutions obtained by SEC-HPLC as a function of pH and Pf1-8 concentration. 44

Figure 3.6. SDS page of the supernatants of the various CN: Pf1-8 and CN alone at pH 6.6 to 3.6 and Pf1-8 alone solution at pH 6.6 and molecular weight markers (MM). 46

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -la : alpha-lactalbumine

β -lg : bêta-lactoglobuline

α -CN : alpha-caséine

β -CN : bêta-caséine

κ -CN : kappa-caséine

Ca : calcium

CN : caséine

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique, de l'anglais « ethylenediaminetetraacetic acid »

HCl : acide chlorhydrique

HPLC : chromatographie liquide à haute performance, de l'anglais «high performance liquid chromatography »

HTC : hydrolysats trypsiques complets

Pf1-8 : Peptide de la bêta-lactoglobuline fragment 1 à 8

PCC : phosphate de calcium colloïdal

*« La lecture et les réflexions sont à l'esprit ce que les aliments sont au corps »
Étienne-François de Vernage (1690)*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Dr. Yves Pouliot, mon directeur de recherche, de m'avoir accepté au sein de son équipe et de m'avoir fait confiance avec son sens critique et ses conseils précieux durant les bons moments et les moments difficiles du projet que j'ai apprécié tout au long de ma maîtrise.

De plus, je veux également remercier mon co-directeur, Dr. Alain Doyen ainsi que le professeur Yves Pouliot pour leur aide à solutionner certains problèmes rencontrés et pour m'avoir accordé énormément de temps et de soutien tout au long de mon projet de recherche. Avec leur enthousiasme débordant, ils ont su me motiver et me permettre de me dépasser jusqu'à la fin. Leurs conseils m'ont aussi permis de m'améliorer sur le plan scientifique. Merci de m'avoir invité à toutes vos réunions d'équipe et aussi pour l'ensemble de votre accueil et disponibilité.

Je les remercie tous les deux directeurs sincèrement. La réalisation de ce projet de maîtrise en collaboration avec eux m'aura donc permis d'apprendre et de me dépasser tant au niveau académique que personnel, et d'accomplir un bon travail.

Ces remerciements ne seraient complets sans remercier Madame Diane Gagnon avec son aide technique précieuse au sein des laboratoires. Sa connaissance analytique m'a permis de résoudre beaucoup des problèmes de recherche en laboratoire. Elle a toujours répondu avec patience à toutes mes difficultés et toujours avec bonne humeur et une grande générosité. De même, je souhaiterais remercier Jacinthe Thibodeau et les personnes du laboratoire de transformation alimentaire, Mélanie Martineau et Pascal Lavoie, pour leur soutien technique.

Aussi, je tiens à mentionner la présence de tous mes collègues étudiants qui ont participé de près ou de loin à mon projet de recherche et avec qui j'ai partagé tous les hauts et les bas de la recherche scientifique.

Je tiens également à remercier ma famille: mes parents pour m'avoir transmis de belles valeurs et support au long de mes études, malgré la distance qui nous sépare, ainsi que mon conjoint, Cassiano Rocha, pour avoir été présent et m'avoir encouragé autant dans les bons moments que dans les moments plus difficiles.

Pour finir, j'aimerais remercier l'organisme subventionnaire : le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) d'avoir supporté la recherche réalisée dans le cadre de ce projet.

AVANT-PROPOS

Composé de quatre chapitres, ce mémoire est présenté sous la forme d'article scientifique dont Madame Raquel Silveira Porto Oliveira est l'auteure principale. Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le cadre de ma maîtrise en Sciences des Aliments au sein du Département des Sciences des Aliments de la Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation de l'Université Laval sous la direction de Dr. Yves Pouliot et la co-direction du Dr. Alain Doyen.

Le Chapitre 1 détaille la revue bibliographique et est organisée de façon à présenter la structure de la β -lg et son hydrolyse trypsique; la production, les caractéristiques physico-chimique et les interactions du peptide Pf1-8 avec les protéines du lait. Par la suite, la structure des micelles de CN, sa déstabilisation et sa possible interaction avec les peptides sont présentés.

Le Chapitre 2 est composé par l'hypothèse de recherche et des différents objectifs qui y sont associés.

Le Chapitre 3, correspondant à l'article scientifique intitulé « *Physicochemical modifications to micellar casein in the presence of the f1-8 peptide generated by tryptic hydrolysis of beta-lactoglobulin* », présente les principales expérimentations réalisées ainsi que les résultats obtenus et la discussion qui en découle. Cet article sera soumis prochainement pour publication dont les auteurs sont: Raquel Silveira Porto Oliveira, Alice Marciniak, Shyam Suwal, Alain Doyen and Yves Pouliot. L'auteure de ce mémoire, qui en a été la rédactrice, a été en charge de la planification et de la réalisation de l'ensemble des expérimentations de ce projet de recherche ainsi que l'analyse des résultats. La révision de l'article a été réalisée par Alice Marciniak (candidate au doctorat) et le Dr Shyam Suwal (stagiaire postdoctoral), dont ils sont coauteurs. Les Dr Doyen et Pouliot ont participé à la planification des expériences, à la discussion des résultats expérimentaux ainsi qu'à la révision de l'article.

Finalement, le Chapitre 4 comporte une discussion générale et la conclusion générale de l'ensemble des résultats et des observations obtenus pendant l'ensemble du projet de maîtrise. Ce dernier chapitre présente les avancées de la recherche, un retour sur l'hypothèse, ainsi que les perspectives futures pour la continuité de ce projet. À la fin de ce mémoire, l'ensemble des travaux cités tout au long de ce projet sont listés dans la bibliographie.

INTRODUCTION

La bêta-lactoglobuline (β -lg), protéine majeure du lactosérum, représente 12% des protéines totales du lait bovin. De conformation globulaire, la β -lg se retrouve sous forme dimérique au pH du lait et comprend une cavité hydrophobe pouvant lier diverses molécules telles que des vitamines liposolubles, du rétinol et certains acides gras (Sawyer 2013).

Cette protéine est très stable au pH acide, mais peu stable à $\text{pH} \geq 9$, à des températures ≤ -32 °C et ≥ 80 °C, en présence de composés organiques, d'ions métalliques et suite à l'application de hautes pressions hydrostatiques (Considine et al. 2007; Dar et al. 2007; Davidovic et al. 2009; Muhammad et al. 2009).

Son hydrolyse par des enzymes digestives humaines (trypsine, chymotrypsine et pepsine) permet la production de peptides (Turgeon et al. 1992; Dufour et al. 1995; Van Willige et Fitzgerald 1995; Stapelfeldt et al. 1996). Certains de ces peptides ont été étudiés pour leurs propriétés fonctionnelles (moussage et émulsification) et bioactives. Plusieurs travaux ont également démontré que certains peptides issus de l'hydrolyse enzymatique de la β -lg ont la capacité de s'auto-assembler pour former des structures spécifiques appelées nanofibres, nanotubes, hydrogels et nanoparticules sphériques (Fairman et Åkerfeldt 2005; Lamm et al. 2005; Haines-Butterick et al. 2007; Ulijn et Smith 2008).

Plus spécifiquement, le peptide f1-8 (Pf1-8) obtenu par hydrolyse trypsique de la β -lg (Pouliot et al. 2009) a démontré plusieurs caractéristiques d'intérêt (Guy 2011; Guy et al. 2011; Ratté 2013). En effet, en plus de sa capacité d'auto-assemblage et de son hydrophobicité, celui-ci fait partie d'un groupe de peptides (comme les peptides β -lg f9-14, f15-40, f142-148) ayant la capacité de se lier à la β -lg et de modifier son profil de dénaturation thermique (Barbeau et al. 1996). Cependant, et dans une optique très fondamentale, il serait également intéressant d'évaluer la capacité d'interaction de ce peptide avec d'autres protéines laitières, telles que les caséines (CN), afin d'évaluer les modifications de propriétés physico-chimiques du mélange qui seraient potentiellement applicables en industries laitière.

Les espèces caséiques du lait se retrouvent s'agencent sous forme de colloïdes appelées micelles de CN qui est insoluble à son point isoélectrique (pH 4,6). Cependant, la précipitation de la CN peut aussi être engendrée par l'ajout de sels. Par ailleurs, lorsque le lait est acidifié, le phosphate de calcium colloïdal des micelles de CN est graduellement solubilisé (Dalgleish et Law 1989), mais les charges négatives associées aux groupes phosphoséryles reticulés sont également titrées et les force de répulsions vont diminuer. La force des liaisons hydrophobes peut être augmentée si les charges

carboxyles sont également neutralisées. Des études ont montré que l'intégrité des micelles de CN est maintenue à pH acide mais que leur comportement de diffusion et leur structure est considérablement modifié du fait d'une perte de phosphate de calcium colloïdal dans les *nanoclusters* suite à l'acidification (Marchin et al. 2007).

La dissociation et le réassemblage des micelles de CN sont également affectés par des facteurs environnementaux tels que le pH. Cette caractéristique est largement exploitée pour le transport de diverses molécules à haute valeur ajoutée et hydrophobes telles que la vitamine D₂, la curcumine, les catéchines du thé, le β -carotène et le ritonavir (Pan et al. 2014; Corzo-Martínez et al. 2015). Finalement, l'interaction des CN avec d'autres constituants alimentaires a été exploitée dans un but techno-fonctionnel. Par exemple, dans la recherche laitière, de nombreuses études ont montré l'interaction de divers stabilisants avec les CN dans les produits laitiers acidifiés. Par exemple, la pectine peut modifier les propriétés physico-chimiques de la CN en modifiant son point isoélectrique et donc ses propriétés de dénaturation et de précipitation. D'un point de vue mécanistique, une répulsion stérique accrue entre les micelles de CN et la pectine peut être introduite, empêchant ainsi la floculation.

Dans le cadre de ce projet, les travaux avaient pour objectif d'évaluer les modifications des propriétés physico-chimiques des CN en présence d'un peptide hydrophobe (Pf1-8) issu de l'hydrolyse trypsique de la β -lg. Les résultats ont montré qu'en présence de ce peptide à un ratio spécifique (1:1 Pf1-8 : CN, concentration de 2,5 mg/mL de chacune des espèces), les propriétés de précipitation/solubilité de la CN à différents pH sont largement modifiées. Ainsi, il est possible que le peptide, de nature très hydrophobe, ait la capacité de déstructurer la micelle et de s'associer spécifiquement à une ou plusieurs espèces caséiques, possiblement de nature hydrophobe, provoquant une modification de sa taille et augmenter sa solubilité.

CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE

1. La bêta-lactoglobuline

Le lactosérum contient 20 % des protéines totales du lait bovin. Il contient trois protéines principales, soit 50 % de bêta-lactoglobuline (β -lg), 20 % d'alpha-lactalbumine (α -la) et 10 % d'albumine de sérum bovin (*bovine serum albumine*, BSA), en plus de traces de lactoferrine, de lactoperoxydase et de plusieurs enzymes (Cayot et Lorient 1998a; Fox et al. 2015b). Pour la suite du document, seule la β -lg sera détaillée, cette protéine faisant partie intégrante du projet de recherche. La β -lg est une protéine globulaire compacte de la famille des lipocalines qui représente environ 50 % des protéines totales du lactosérum. La β -lg est connue pour sa capacité à lier de petites molécules principalement hydrophobes - comme les acides gras, rétinol, vitamine D, entre autres - à se lier aux récepteurs de surface spécifique à former des complexes macromoléculaires (Wang et al. 1998; Aggeli et al. 2001; Sawyer 2003, 2013, Yang et al. 2003, 2008; Grzyb et al. 2006; Mehra et O'Kennedy 2008).

1.1. Structure de la β -lg

La β -lg, de masse moléculaire d'environ 18 kDa, est composée de 162 acides aminés (Figure 1.1). Jusqu'à présent, 11 variants génétiques de la β -lg du lait bovine (*Bos genus*) ont été identifiés (β -lg A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W) (Caroli et al. 2009). Les 3 variants couramment dosés dans le lait bovin étant les variants β -lg A, β -lg B et β -lg C (Piez et al. 1961; Farrell et al. 2004). Les variants A et B se différencient par les acides aminés en position 64 (A : Asp; B : Gly) et 118 (A : Val; B : Ala). Les variants β -lg B et β -lg C diffèrent par la composition en acide aminé en position: 59 (B : Gly; C : His) (Tableau 1.1).

a)

LIVTQTMKGL DIQKVAGTTW SLAMAASDIS LLDAQSAPLR⁴⁰
VYVEELKPTP EGDLEILLQK DENDECAQKK IIAEKTIP⁸⁰
VFKIDALNEN KVLVLDTDYK KTL^LFCMENS AEPEQSLVCQ¹²⁰
CLVRTPEVDD EALEKFDKAL KALPMHIRLS FNPTQLEEQC¹⁶⁰
HI¹⁶²

b)

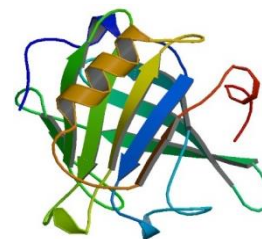


Figure 1.1 Structures primaire (a) et tridimensionnelle (b) de la β -lg (variant A).

La conformation de la β -lg est le plus souvent monomérique et dimérique, cette dernière étant prédominante dans les laits de ruminants (Sawyer 2013). Sa structure varie grandement selon les paramètres physico-chimiques du milieu (pH, force ionique, température, pression, *etc.*). La structure secondaire de la β -lg est formée de 8 % d'hélices α , de 45 % de feuillets β et de 47 % de structures aléatoires (Sawyer 2003).

La structure tertiaire de la β -lg native est composée de neuf feuillets β antiparallèles qui sont localisés entre les positions 15-24, 35-44, 49-56, 65-74, 82-85, 91-97, 102-111, 116-124 et 145-150.

Tableau 1.1. Les différents variants génétiques de la β -lg et leurs variations d'un point de vue de la position des acides aminés. Adapté de Caroli et al. (2009).

Variantes	Diffusion	Espèces*	Position											
			45	50	56	59	64	70	78	108	118	126	129	158
A	Plus commun	T,I,G	Glu	Pro	Ile	Gln	Asp	Lys	Ile	Glu	Val	Pro	Asp	Glu
B	Plus commun	T,I,G					Gly				Ala			
C	Plutôt commun	T				His	Gly				Ala			
D	Plutôt commun	T	Gln				Gly				Ala			
E	Plus commun	G,J					Gly				Ala			Gly
F	Rare	J		Ser			Gly				Ala		Tyr	Gly
G	Rare	J					Gly		Met		Ala			Gly
H	Rare	T						Asn						
I	Rare	T					Gly			Gly	Ala			
J	Rare	T					Gly				Ala	Leu		
W	Rare	T			Leu		Gly				Ala			

*T = Bos taurus; I = Bos indicus; G = Bos grunniens; J = Bos javanicus.

Cette conformation de la protéine induit la formation d'une cavité fortement hydrophobe au cœur de la protéine. Cette cavité a la caractéristique d'être constituée de deux ponts disulfure (S-S) aux positions 66-160 et 106-121 ou 106-119 situés au cœur de la protéine (Papiz et al. 1986; Monaco et al. 1987), et d'un groupement thiol (SH) libre en position 121 ou 119 (McKenzie et Shaw 1972). La position du groupement thiol varie en fonction des réactions d'échange SH/S-S, lesquelles sont influencées par le pH et la température du milieu. La cavité hydrophobe a fait l'objet de multiples études dont plusieurs en lien avec sa capacité de liaisons avec diverses molécules hydrophobes (Sawyer et al. 1998) telles que le rétinol et plus généralement les rétinoïdes, les acides gras, les triglycérides, les hydrocarbures

aromatiques, les composés d'arôme ainsi que le β -ionone et l'ergocalciférol (vitamine D₂) (Brownlow et al. 1997; Kontopidis et al. 2004). Cette caractéristique est très importante pour l'industrie nutraceutique parce qu'elle permet de protéger ces molécules bioactives de la dégradation thermique, par oxydation et irradiation et de libérer ces molécules d'intérêt seulement après la digestion (Hattori et al. 1995).

1.2. Propriétés physico-chimiques

Le premier paramètre affectant la structure et les propriétés physico-chimiques de la β -lg est la température. Ainsi, la dénaturation de cette protéine débute à 65 °C et est presque totale après chauffage à 90 °C pendant 5 minutes. De manière plus spécifique, lorsque la température atteint 55°C, le dimère va se dissocier et former 2 molécules monomériques (à pH neutre). Après dissociation et jusqu'à 60°C, seulement quelques ponts hydrogènes intramoléculaires sont rompus, mais la protéine conserve la grande majorité de sa structure tertiaire. Les modifications pouvant survenir en dessous de 60°C seraient pour la majorité réversibles. Entre 65 et 75 °C, les changements de la structure tertiaire sont suffisamment importants pour exposer les régions hydrophobes et activer le groupement sulfhydrile libre et que la protéine ne puisse plus retrouver son état natif. En prolongeant l'exposition de la β -lg aux hautes températures, le dépliement des structures tertiaires et secondaires est accentué, rendant le groupement sulfhydrile davantage réactif. Des oligomères sont ainsi formés par des liaisons non-covalentes (associations hydrophobes et induite par la présence de sel) qui se produisent principalement entre 75 °C et 85 °C. Les associations hydrophobes sont limitées à des températures supérieures à 85 °C, en raison des changements de la structure de l'eau. Enfin, le déroulement de la structure de la protéine résiduelle est observé entre 125 °C et 150 °C, probablement induite par la décomposition chimique de liaisons disulfures (Sawyer 2003; de Wit 2009).

Le deuxième facteur ayant des effets sur la β -lg est le pH. Entre pH 2 et 13, la β -lg présente un certain nombre des transitions structurelles locales et globales. À pH inférieur à 3,5, la β -lg existe sous forme de dimères et aucune altération peptidique n'apparaît dans sa structure. De plus, elle possède une certaine résistance à la dénaturation à pH 2. Entre pH 3.5 et 5.5, la β -lg subit une transition structurale, passant de dimères à octamères par la mise en jeu d'interactions protéine-protéine. (Sawyer et Kontopidis 2000). Entre pH 4.5 et pH 6, la structure de la β -lg passe d'une forme native étendue (Q-forme) à une forme plus compacte (N-forme). Cette transition Q-à-N peut induire des changements structuraux et des changements au niveau de son hydratation (Taulier et Chalikian 2001). Entre le pH 7,1 et 8,2, la β lg subit une transition qui est connu comme la transition de Tanford (N-R) (Tanford et al.

1959). Le début de cette transition est causé par le groupement carboxyle du résidu Glu₈₉, enfouis à pH 6,2 et exposé à pH 7,1 et 8,2 et par l'ouverture de la cavité hydrophobe de la molécule par de potentielles interactions hydrophobes (Qin et al. 1998). Au pH basique (>9), la β -lg est dénaturée. Cette dénaturation est irréversible et entraîne une augmentation de la réactivité des groupements thiols qui induisent une interruption globale de ces structures secondaires et tertiaires (Taulier et Chalikian 2001). La Figure 1.2 montre une représentation schématique du changement de la structure de la β -lg en fonction du pH.

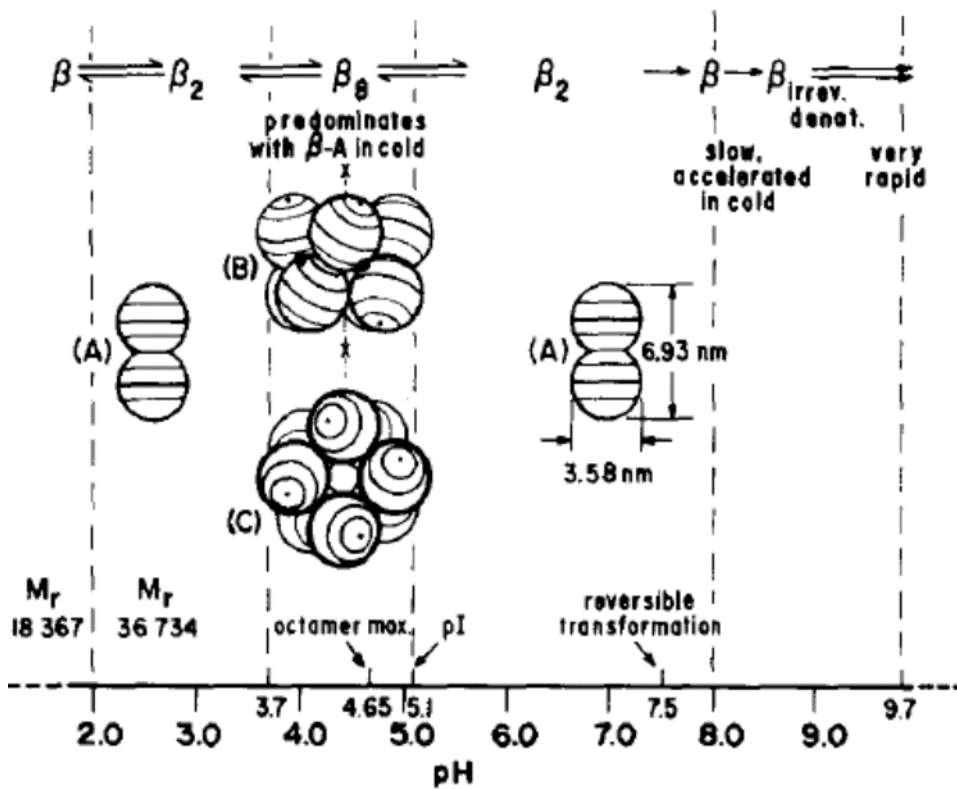


Figure 1.2 Représentation schématique de changement de la structure de la β -lg en fonction du pH (Pessen et al. 1985).

La présence des sels va également impacter sur la structure de la β -lg. L'addition de NaCl à pH 2, à température pièce va induire une modification au niveau de la β -lg, celle-ci va passer de la forme monomérique à la forme de dimères. À pH 7, la β -lg va évoluer de la forme dimérique vers un degré d'association supérieure lorsque le milieu est enrichi en NaCl. Le sel va favoriser les interactions entre les résidus non polaires (hydrophobes) en réduisant les répulsions électrostatiques de la protéine

(Cayot et Lorient 1998a). Par exemple, l'ajout du CaCl_2 (1 à 15 mM) induit des changements mineurs de la conformation de la β -lg (ces changements sont différents par la présence de NaCl). En présence de sels, l'hydrophobicité de la β -lg et la réactivité des groupements « S-H » vont favoriser la formation d'un gel protéique (Jeyarajah et Allen 1994).

Cette section résume ainsi l'effet des paramètres physico-chimiques majoritairement appliqués en industries alimentaires pour modifier la structure de la β -lg. Cependant, bien qu'intéressantes pour ces propriétés fonctionnelles, un nombre conséquent de travaux ont été effectués sur l'hydrolyse enzymatique de la β -lg, plus particulièrement par la trypsine, afin de connaître précisément sa structure tridimensionnelle de la protéine native mais également dans le but de générer des espèces peptidiques d'intérêts majeurs pour leurs propriétés fonctionnelles et biologiques.

1.3. . Hydrolyse trypsique de la β -lg

Les enzymes protéolytiques hydrolysent les liaisons peptidiques permettant ainsi de générer des peptides ayant des propriétés physico-chimiques (taille, charge) variables (Adler-Nissen 1976). Contrairement à l'hydrolyse chimique, l'hydrolyse enzymatique permet de mieux contrôler le rendement et la qualité des produits finaux tout en diminuant les risques de réactions secondaires. De plus, les paramètres d'hydrolyse sont généralement non dénaturants pour la protéine à traiter – température optimum de 37 °C et pH entre 4 et 9 (Otte et al. 1997). Le choix des conditions d'hydrolyse est généralement dicté par trois paramètres distincts : la protéine initiale à hydrolyser, la spécificité de l'enzyme et le degré d'hydrolyse. La vitesse d'hydrolyse protéolytique est quant à elle influencée par 4 facteurs : la concentration du substrat, le pH, la température et le ratio enzyme/substrat. Dans le cas de l'hydrolyse des protéines du lactosérum, il a été démontré que les changements structuraux engendrés par l'étape d'hydrolyse modifient les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines sériques telles que leur solubilité, leurs propriétés émulsifiantes et gélifiantes (Turgeon et al. 1992; Gauthier et Pouliot 2003). De plus, divers travaux ont montré que des peptides bioactifs susceptibles d'intervenir au niveau de nombreuses fonctions physiologiques chez l'homme ont été identifiés dans la séquence primaire des protéines du lactosérum (Pihlanto-Leppala et al. 1998; Vermeirssen et al. 2004; Korhonen et Pihlanto 2006).

Pour l'hydrolyse de la β -lg, la trypsine est possiblement l'enzyme la plus utilisée et donc étudiée. Cet enzyme est une sérine endoprotéase (poids moléculaire de 23,3 kDa) qui clive les liens du côté carbonyle des résidus arginine et lysine (Olsen et al. 2004). La trypsine est isolée du pancréas de différents mammifères ainsi, chaque trypsine présente des conditions optimales

d'utilisation. L'hydrolyse trypsique de la β -lg est généralement réalisée à pH 7-9, à une température constante de 37 °C et en présence d'ions Ca^{2+} , afin de stabiliser l'enzyme. Les peptides issus de la digestion trypsique de la β -lg (Tableau 1.2), de même que leur cinétique de formation et de dégradation ont été étudiés récemment (Fernández et Riera 2013). Ces peptides possèdent des propriétés gélifiantes et émulsifiantes, ainsi que des activités biologiques (hypocholestérolémie, antihypertenseurs, antimicrobiens, etc.) (Tableau 1.2).

Tableau 1.2. Séquences et propriétés biologiques des fractions peptidiques obtenues suite à l'hydrolyse trypsique de la β -lg.

Peptides	Propriétés/Activité Biologique	Référence
f(1–8)	Gélifiante	(Guy et al. 2011)
f(9–14)	Inhibiteur-ECA et Hypocholestérolémie	(Pihlanto-Leppala et al. 1998) et (Nagaoka et al. 2001)
f(15–20)	Inhibiteur-ECA et Antimicrobien	(Pihlanto-Leppala et al. 1998) et (Pellegrini et al. 2001)
f(21–40)	Émulsifiant	(Turgeon et al. 1992)
f(41–60)	Émulsifiant et Hypocholestérolémie	(Turgeon et al. 1992) et (Nagaoka et al. 2001)
f(61–70)		
f(71–75)	Hypocholestérolémie	(Nagaoka et al. 2001)
f(76–77)		
f(78–83)	Antimicrobien	(Pellegrini et al. 2001)
f(84–91)		
f(92–100)	Antimicrobien	(Pellegrini et al. 2001)
f(102–124)		
f(125–135)		
f(136–138)		
f(139–141)		
f(142–148)	Inhibiteur-ECA	(Mullally et al. 1997)
f(149–162)		

Parmi l'ensemble des peptides générés par l'hydrolyse trypsique de la β -lg, le peptide Pf1-8 a fait l'objet d'études très originales en lien avec sa capacité d'auto-agrégation permettant d'engendrer sa purification. Ainsi, les prochaines sections de la présente revue de littérature se focaliseront principalement sur ce peptide.

2. Le peptide f1-8

2.1. Structure du peptide f1-8

Le fragment peptidique f1-8, obtenu suite à l'hydrolyse trypsique de la β -lg, est constituée des huit premiers acides aminés de la protéine à partir de son extrémité N-terminale. La séquence du peptide est : Leu-Ile-Val-Thr-Gln-Thr-Met-Lys (Figure 1.3) et sa masse moléculaire est de 933,5 Da. Son point isoélectrique (pI) est de 8,75 (classifié comme un peptide basique) et une hydrophobicité relativement élevée de $1.34 \text{ kcal.mol}^{-1}$. (Pouliot et al. 2009; Fernández et al. 2014). Sa haute hydrophobicité est facilement expliquée par sa composition en acides aminés hydrophobes– Leucine, Isoleucine et Valine. Tout dépendamment des conditions de pH, de concentration et de température utilisées pour sa solubilisation, le peptide peut s'auto-assembler en formant des hydrogels ou des nanofibres (Guy et al. 2011).

a)



b)



Figure 1.3 Séquence du peptide β -lg f1-8, a) Jaune – Acides aminés apolaires; Bleu- Acides aminés polaires et Vert- Acides aminés chargés basique et b) structure du peptide Pf1-8 en trois dimensions (Adapté de Pouliot et al.(2009).

2.2. Étapes de production du peptide f1-8

Le Pf1-8 a été obtenu selon la méthode décrite par Chay Pak Ting et al. (2007) (Figure 1.4). Plus spécifiquement, une solution d'isolat de protéines de lactosérum (IPL) de 10 % (p/v), additionnée 0,01 M de CaCl_2 afin de stabiliser la trypsine, a été produite. Le pH de la solution est ajusté à 8,0 à l'aide de NaOH (4 N) et la température est maintenue à 37 °C. L'hydrolyse est initiée par l'ajout d'une solution

de trypsine (10 %, p/v) dissoute dans du HCl 0,001 N. Le ratio enzyme: substrat utilisé est de 1:700 (Ratté, 2013). Pendant la réaction d'hydrolyse, le pH de la solution est constamment ajusté à 8,0 à l'aide de NaOH 4 N. La réaction hydrolytique est stoppée lorsqu'un degré d'hydrolyse (DH) de 5,6 % est atteint (del Toro et García-Carreño, 2002). Par la suite, une ultrafiltration (UF) (membrane de polyéthersulfone de 10 kDa, température de 40 °C, pression transmembranaire de 4,5 bar) est réalisée sur l'hydrolysats. Le perméat récolté, représentant l'hydrolysats trypsique complet (HTC) est par la suite concentré par OI (membrane de polyamide 300 Da, pression transmembranaire de 13,5 bars, température de 25 °C) jusqu'à l'obtention d'un concentré blanchâtre synonyme d'auto-assemblage du Pf1-8. Suite à l'étape d'OI, le rétentat est récupéré puis lyophilisé afin d'être purifié en Pf1-8. Pour cela, le lyophilisats enrichi en Pf1-8 est réhydraté (eau de grade HPLC ou Milli-Q) à une concentration de 5% (p/v), puis centrifugé à 5000 × g pendant 12 min à 20 °C. Pour augmenter la pureté du Pf1-8, le culot est re-suspendu dans un même volume d'eau HPLC, puis re-centrifugé quatre autres fois dans les mêmes conditions. Finalement, le peptide purifié est lyophilisé et conservé à -20 °C.

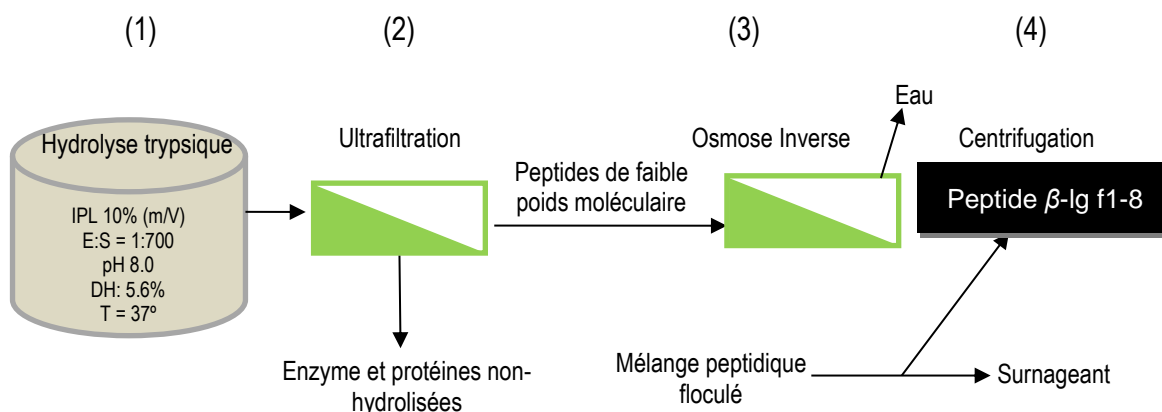


Figure 1.4. Étapes du processus de production du Pf1-8 selon la méthode de Pouliot et al. (2009).

2.3. Effet du pH et de la concentration en Pf1-8 sur sa solubilisation

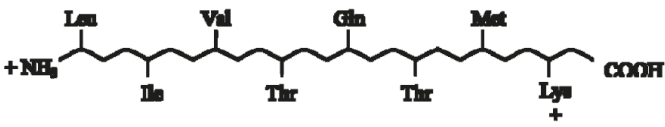
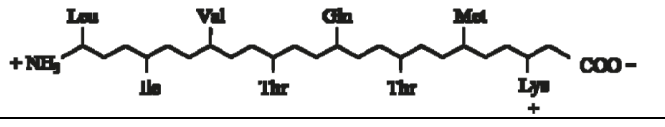
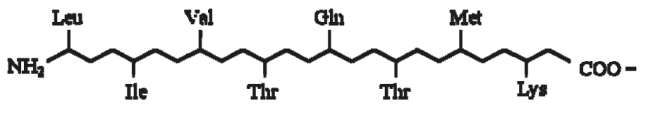
L'étude de la solubilisation et de l'auto-assemblage du Pf1-8 à différents pH et concentrations peptidiques a montré qu'à des pHs compris entre 1,0 à 2,0, et peu importe les concentrations peptidiques testées, les solutions restaient limpides suggérant ainsi l'absence d'auto-assemblage du Pf1-8. Cependant, une floculation peptidique a été observée à des valeurs de pH comprises entre 3,0 et 8,0 lorsque la concentration peptidique est supérieure à 2,5 mg/mL (Tableau 1.3). Des hydrogels fermes/opaque se sont plutôt formés entre pH 9,0 et 11,0, à des concentrations peptidiques comprises supérieures à 50 mg/mL (Guy et al. 2011). La formation d'hydrogel est influencée par des changements de charge des acides aminés sur le Pf1-8 à un pH >9,6 (Tableau 1.4) (Pouliot et al. 2009). L'extrémité

N-terminale du peptide perd sa charge positive à pH >9,6, puis, la chaîne latérale de la lysine perd sa charge positive à pH >10,5 (Guy et al. 2011).

Tableau 2.1. Caractéristiques visuelles des solutions dans l'eau à différentes concentrations du peptide β -lg f1-8 en fonction du pH (Adapté de Guy et al. (2011)).

Concentration en peptide	pH										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
< 2,5 mg/mL	Solution claire					Solution trouble					
> 2,5 mg/mL	Solution claire		Particules floculées en suspension						Formation d'hydrogels		

Tableau 2.2. Caractéristiques structurales du Pf1-8 en fonction du pH^a. Adapté de Guy et al. (2011)

pH	État d'ionisation	Distribution de charges ¹	Structure secondaire ²	Interactions du peptide	
1	I		<p>Conformation aléatoire</p> <p>Feuillet β</p>	Répulsions maximales (protonées)	
2				II	Interactions électrostatiques
3	Agrégation				
4					
5		III			Attractions / répulsions optimales entre les peptides monomères
6					
7					
8		IV			
9					
10					
11					

^{a1} les valeurs de pK pour les ionisations sont 2,2 (II), 9,6 (III) et 10,5 (IV). ² Comme déterminé par dichroïsme circulaire dans Pouliot et al. (2009) à une concentration de 0,4 mg / mL.

Les spectres de dichroïsme circulaire (Pouliot et al. 2009) ont démontré que l'impact du pH sur la formation d'un hydrogel est susceptible d'être entraînée par des changements dans la répartition de la charge du Pf1-8. Comme montré dans le tableau 1.4, les deux transitions de charges portées par le Pf1-8 se produisent dans l'intervalle de pH où la formation d'un hydrogel a été observée. Tout d'abord, le groupe N-terminal du peptide perd sa charge positive à pH 9,6, puis, la chaîne latérale de la lysine perd sa charge positive à pH 10,5 (Guy et al. 2011).

2.4. Effet de la concentration du Pf1-8 sur sa structure secondaire

La concentration du Pf1-8 influence sa conformation et, donc, sa solubilité en solution (Fig. 1.5). À des concentrations comprises entre 0,4 et 1,0 mg/mL et à pH 10, la structure secondaire du Pf1-8 adopte principalement une conformation aléatoire, tandis qu'à des concentrations comprises entre 1,0 et 1,5 mg/mL, la solution contient un mélange, en proportions variables, de peptides de conformations aléatoires et d'autres assemblés en feuillets β (Guy et al. 2011). Une concentration peptidique $>1,5$ mg/mL favorise les interactions peptide-peptide et la formation d'agrégats supramoléculaires définis. À un pH $>2,0$ et à une concentration peptidique $>1,5-2,0$ mg/mL, les Pf1-8 adoptent une conformation en feuillet β (Tableau 1.3, Fig. 1.5). Les unités peptidiques interagissent entre-elles (auto-assemblage), ce qui peut mener à la formation de structures insolubles plus complexes (nanofibres et hydrogels).

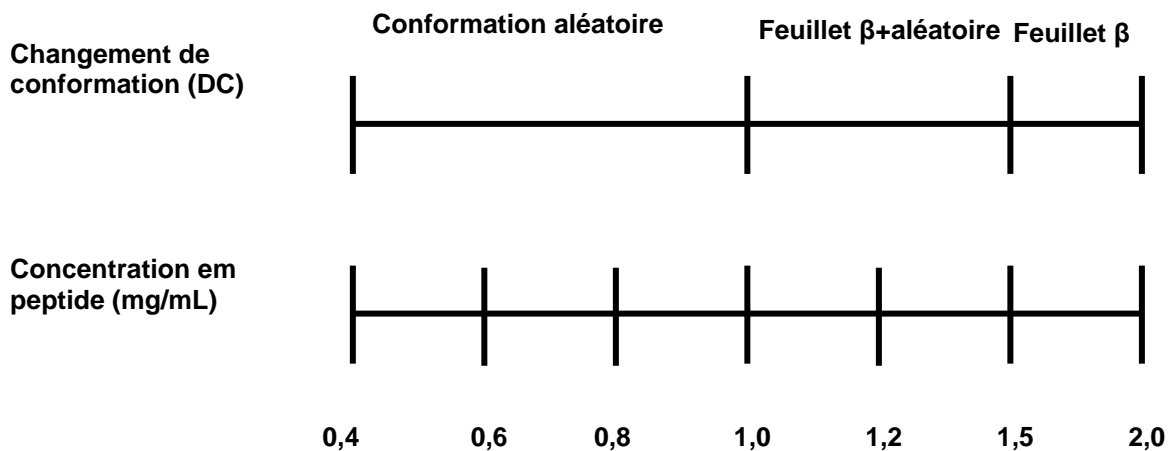


Figure 1.5. Conformation du Pf1-8 observée par DC à pH 10 en fonction de la concentration - Adapté de Guy et al. (2011).

2.5. Modèle d'auto-assemblage du Pf1-8

Le Pf1-8 peut s'auto-assembler, c'est à dire se lier à lui-même par un mécanisme hiérarchique et ordonné grâce à trois types d'interactions. Tout d'abord par des interactions hydrophobes via l'extrémité N-terminale (résidus Leu-Ile-Val et Met) déclenchant ainsi le repliement du peptide et induisant une conformation en feuillets β . Cette première étape est essentielle, car les interactions hydrophobes agissent comme la force motrice de l'auto-assemblage. Cette conformation en feuillets β est ensuite stabilisée par la formation de liaisons hydrogènes au niveau de ses chaînes latérales (Thr-Glu-Thr), au centre du peptide.

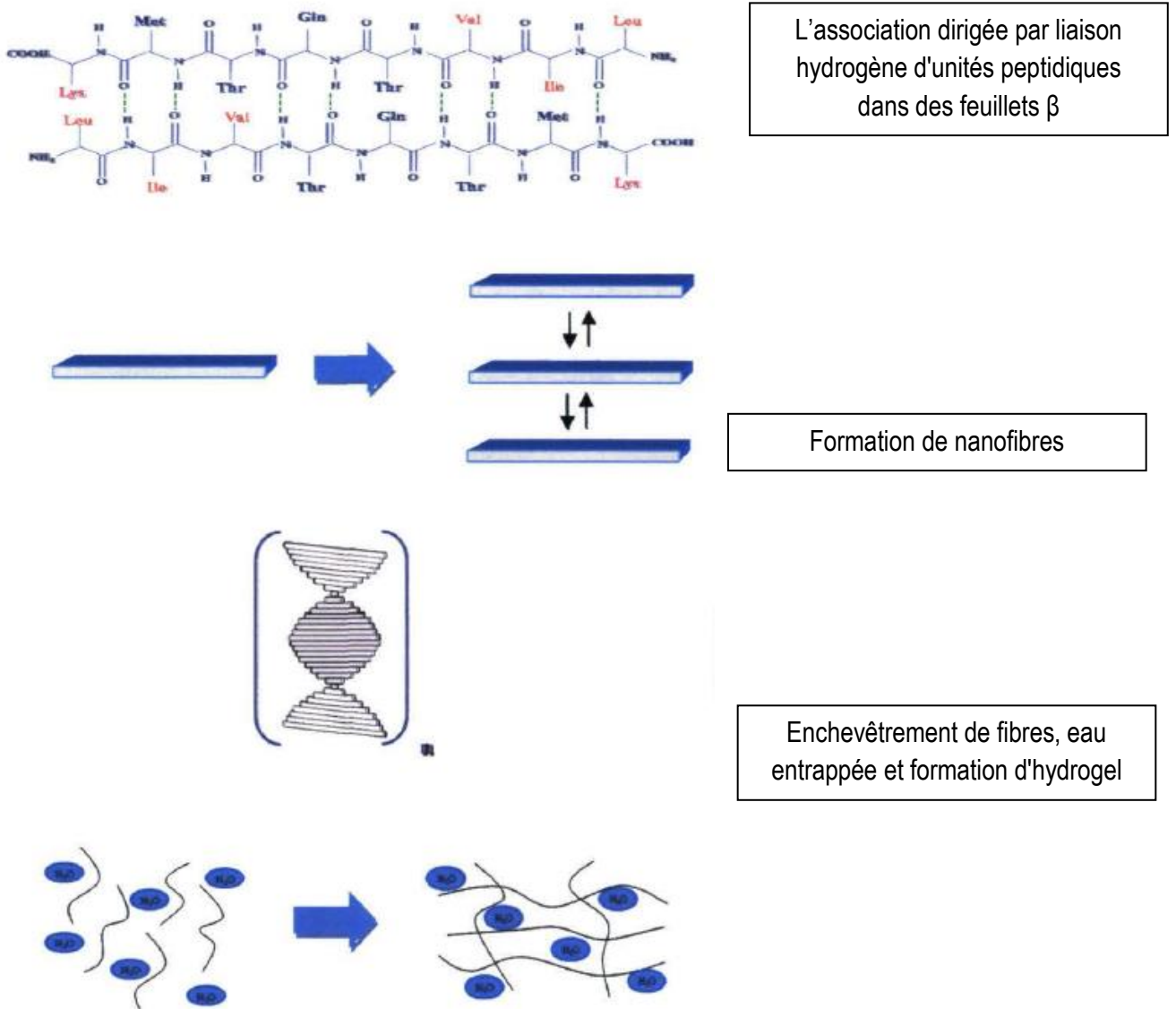


Figure 1.6. Un modèle proposé pour l'auto-assemblage du Pf1-8. Adapté de Guy et al. (2011).

Selon la Figure 1.6, pour le modèle d'auto-assemblage (Guy et al. 2011), la chaîne latérale de la lysine serait exposée à l'extérieur du feuillet β , ce qui expliquerait l'importance des interactions électrostatiques attractives et répulsives qui contrôlent l'auto-assemblage du Pf1-8. Enfin, les interactions électrostatiques, via son extrémité C-terminale hydrophile (résidu Lys), permettent l'équilibre entre les interactions hydrophobes et électrostatiques nécessaires au déclenchement de l'auto-assemblage.

2.6. Interaction du Pf1-8 avec certains ligands

Dans les matrices alimentaires, la présence de certains peptides spécifiques (fractions peptidiques f75-89, f75-108, f135-157 et f135-158 de la β -lg) est susceptible de modifier les propriétés fonctionnelles des protéines telles que les propriétés de gélification et les phénomènes d'agrégation (Chen et al. 1994; Barbeau et al. 1996; Otte et al. 2000; Creusot et Gruppen 2007a). Ces interactions protéines-peptides sont généralement engendrées par des liaisons non-covalentes (Noiseux et al. 2002; Kosters et al. 2010). En effet, une étude a suggéré que les interactions peptides-protéines dépendent d'un équilibre entre les interactions de répulsions et d'attractions électrostatiques (entre des molécules chargées) et les interactions hydrophobes (Creusot et Gruppen 2007b).

Des travaux récents ont démontré que la présence du Pf1-8 provoque des changements au niveau de la solubilité de l' α -la à différents pH (4,5 – pI- et 7) (Ratté 2013). La mise en contact de l' α -la avec l'HTC a provoqué une augmentation de la solubilité de la protéine à son point isoélectrique (pI), tandis que le mélange α -la: Pf1-8 a engendré une forte diminution de sa solubilité à des valeurs de pH supérieures au pI (4,5). Ces différences entre les profils de turbidité suggèrent que l'action du peptide varie selon qu'il soit compris dans une fraction contenant des protéines solubles ou non solubles. Étant donné que les effets des substrats sur la solubilité de l' α -la sont principalement observés autour de son pI et qu'il s'agit d'une région où la protéine devient plus hydrophobe (forme apo-protéine), il est probable que ces interactions soient de nature hydrophobe. Par contre, suite à des analyses calorimétriques, il a été démontré que la présence du Pf1-8 n'influence pas le profil de dénaturation thermique de l' α -la puisqu'aucun changement significatif n'a été mesuré pour les valeurs de la température de dénaturation et les valeurs d'enthalpie de dénaturation à pH 4,5 et pH 7,0.

Dans le cadre du projet présenté dans ce document, une étude très fondamentale de l'impact de l'interaction Pf1-8/CN sur les modifications de propriétés physico-chimiques de la CN est proposée.

Par conséquent, les prochaines sections détaillent la structure de la CN et ses propriétés physico-chimiques.

3. Les caséines du lait

3.1. Composition et propriétés

Le lait est composé de particules colloïdales appelées micelles de CN (Fig. 1.7) qui sont composées d'un complexe de protéines associées et de phosphate de calcium. Selon le *Milk Protein and Enzyme nomenclature committee* de l'American Dairy Science Association, les CN bovines sont définies comme les phosphoprotéines qui précipitent du lait cru par acidification à pH 4,6 à 20 °C (De Kruif et al. 2012). Les CN, qui représente 80% des protéines du lait bovin, sont la fraction protéique majeure de ce fluide laitier (Mcsweeney et Fox 2013; Bylund et al. 2015). Ces colloïdes d'association hétérogènes sont appelés micelles de CN.

La micelle de CN est de forme sphérique (Figure 1.7), la fraction protéique comptant pour plus de 93% de sa masse sèche. La micelle de CN est composée de quatre espèces différentes dont les caractéristiques sont listées dans le tableau 1.5 : l' α_{s1} -CN, l' α_{s2} -CN, la β -CN et la κ -CN. La micelle est également constituée de quelques fragments peptidiques (les caséines γ) issus de la protéolyse de la β -CN par la plasmine et de minéraux (7% du poids sec) dont 90% de phosphate de calcium. Les micelles de CN ont un diamètre moyen de 128 nm et un potentiel de surface variant entre -15 et -20 mV (Schmidt et al. 1974; Eck et Gillis 2006).

Tableau 3.1. Composition et caractéristiques physicochimiques des CN du lait de vache

	Caséines			
	α_{s1}	α_{s2}	β	κ
Composition moyenne (g/100 g)	33	11	33	11
Poids moléculaire en daltons	23612	25228	23980	19005
Point Isoélectrique	6	5.3	5.2	5.6
Hydrophobicité (Kj/résidu)	4.89	4.64	5.58	5.12
Charge à pH 6.6 (mV)	-20.9	-14.8	-12.3	-3.9

Les trois sous-groupes de CN (Figure 1.8), comme la α_s -CN, la κ -CN et la β -CN, sont tous hétérogènes et se composent de 2 à 8 variants génétiques. Les variants génétiques d'une protéine ne diffèrent que par quelques acides aminés. Les trois sous-groupes ont en commun le fait que l'un des deux acides

aminés contenant des groupes hydroxy est estérifié à l'acide phosphorique. L'acide phosphorique lie le calcium et le magnésium et certains des sels complexes pour former des liaisons inter et intramoléculeaires qui stabilisent les micelles.

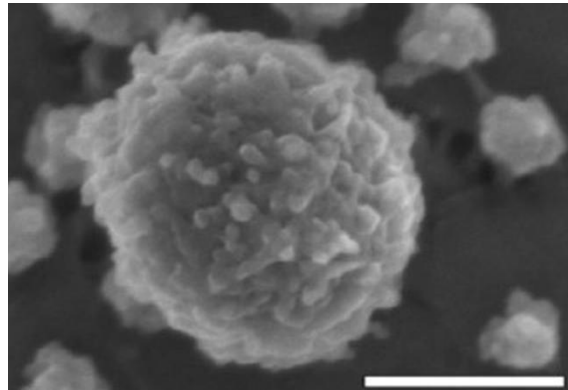


Figure 1.7. Micrographie électronique d'une micelle de CN individuelle, réalisée en utilisant la technique de la microscopie électronique à balayage à effet de champ par Dalglish et al. (2004).

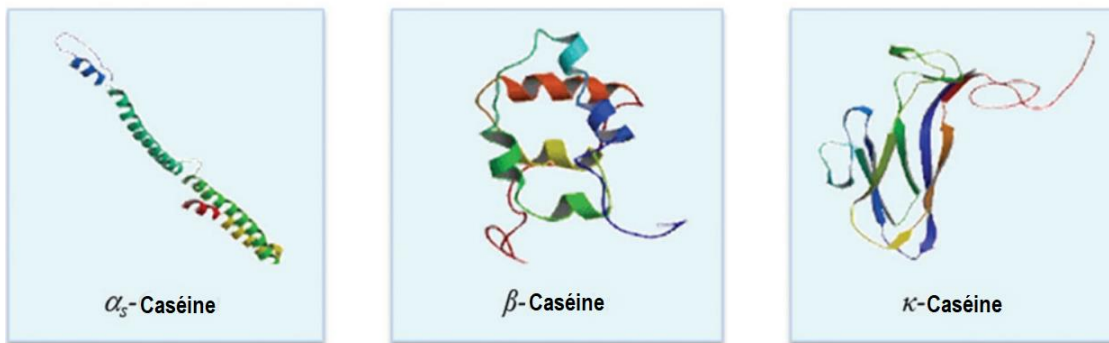


Figure 1.8. Représentation des structures tridimensionnelles de la α_s -, β - et κ -CN. Adapté de Ortega-Requena and Rebouillat (2015).

3.2. Les micelles de CN et leurs structures

La structure supramoléculaire de les micelles de CN est irrégulière et permet une grande diversité de liaisons entre les protéines, y compris les prolongateurs de chaîne (β -CN ou α_1 -CN), les points de ramification (α_1 -CN ou α_2 -CN), les terminateurs de chaîne (κ -CN), et des points d'emboîtement (*nanoclusters* de phosphate de calcium). Sur la périphérie de la micelle, certaines chaînes de protéines peuvent s'étendre vers l'extérieur, plaçant la κ -CN (soit individuellement ou en tant que polymères liés par un pont disulfure) dans la masse de la micelle. Le nombre de ces protubérances sur la surface de la micelle de la CN est inférieur à ce qui a été postulé dans les premiers modèles de ce colloïde (couche velue (Horne 1984) ou brosse polymère (de Kruif et Holt 2003)). En effet, divers modèles d'assemblage et de structure de la micelle de CN ont été proposés et ont fait l'objet de révisions et d'évaluations régulières (de Kruif et Holt 2003). Les quatre principaux sont : le modèle « cœur- enveloppe » de Waugh (1958), le modèle sous-micellaire de Slattery et Evard (Slattery et Evard, 1973; Slattery, 1977), élaboré ensuite par Schmidt (1980); (ii) et le modèle *nanocluster* de Holt 1992 et 1994 et (iii) le modèle de micelles de CN plus récent le modèle à dualité des liens proposé par Horne (1998) (Figures 1.9 à 1.12).

- Modèle « cœur- enveloppe » de Waugh (1958)

Le modèle, représenté à la Figure 1.9, est basé sur des complexes β -CN et α -CN au cœur de la micelle en présence de calcium. Une couche de protection schématisée par une « enveloppe » de κ -CN à la surface de la micelle maintenue par des interactions stables avec la α -CN a été décrite permettant d'éviter la précipitation de la micelle.

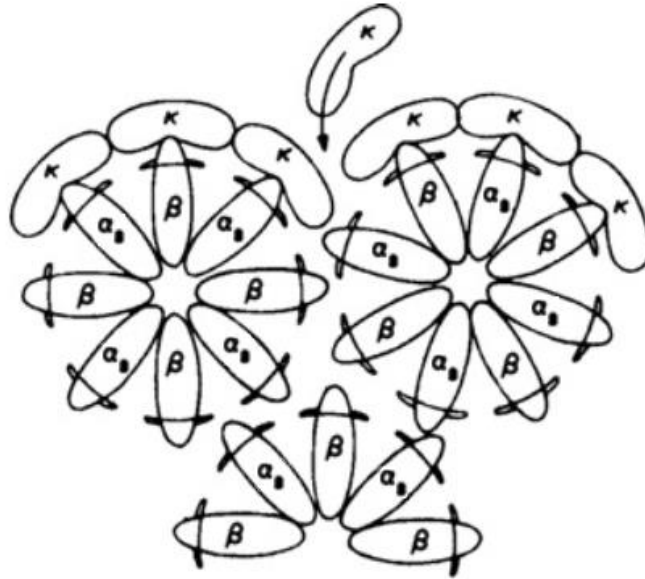


Figure 1.9. Modèle de représentation de micelles de CN proposé par Waugh (1958). Adapté de De Kruif et al. (2012).

- Modèle sous-micellaire

Ce modèle décrit que les sous-micelles en profondeur seraient essentiellement composées de CN α_1 -CN, α_2 -CN, β -CN et formeraient un cœur hydrophobe constitué des fragments apolaires des CN et reliées par du phosphate de calcium. En surface des sous-micelles, les espèces κ -CN sont présentes de façon prépondérante ce qui confère un caractère hydrophile à la micelle. La surface de la micelle serait constituée des segments polaires des CN (résidus phosphorylés des CN α_1 , α_2 et β , des CMP des κ -CN) qui assureraient la stabilité des micelles de CN face au calcium et limiteraient la croissance de la micelle. La teneur en α -CN serait constante dans chaque sous unités tandis que les teneurs en β et κ -CN varieraient selon la place de la sous unité au sein de la micelle. Les zones hydrophobes des β et κ -CN seraient incrustés dans le réseau formé par les α -CN (Figure 1.10) (Slattery et Evard 1973; Slattery 1977).

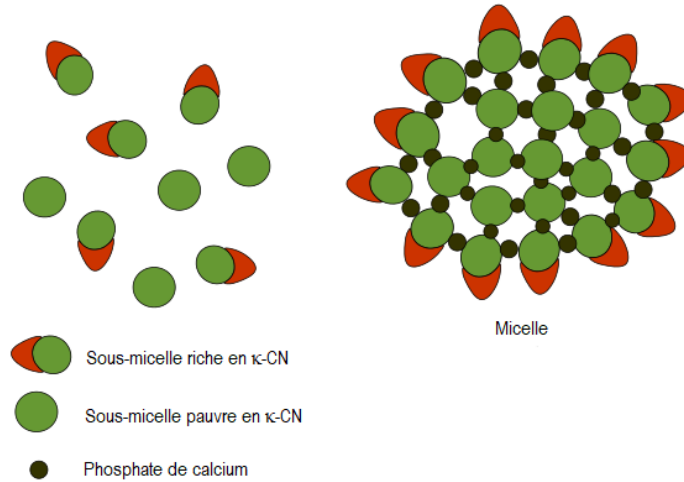


Figure 1.10. Représentation de la structure sous-micellaire Adapté de Horne (2006).

- Modèle « nanoclusters »

Le modèle, proposé par Holt (Holt et al. 1998), suggère que la micelle de CN aurait la forme d'une nappe constituée d'un enchevêtrement de molécules de CN flexibles formant une structure de type gel dans laquelle des microgranules de phosphate de calcium colloïdal (PCC) font partie intégrante de la surface C-terminale de la κ -CN. Ces modèles conservent deux des caractéristiques centrales du modèle sub-micellaire, à savoir le rôle de cimentation du PCC et l'emplacement prédominant en surface de la κ -CN. Dans ce modèle de *nanocluster*, le PCC est dispersé sous forme de petites « pierres de cerise » dans une matrice protéique homogène (un nanogel) (Figure 1.11).

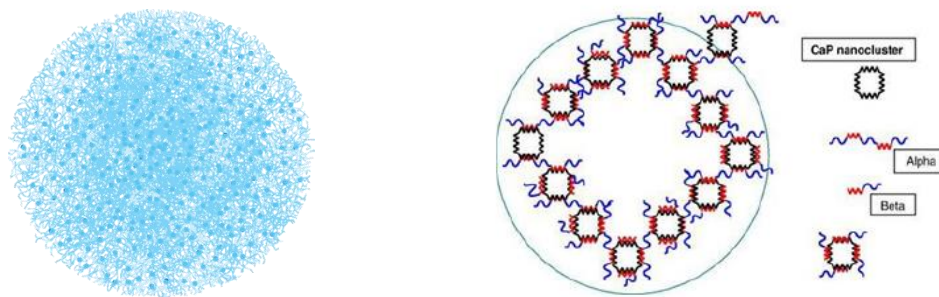


Figure 1.11. Modèle *nanoclusters* et la illustration de la liaison entre les α_2 et β -CN avec le phosphate de calcium pour former un pont et compléter la chaîne selon(Holt et al. 1998). Adapté de Horne (2006)

Le modèle *nanocluster* (Holt 1992) est basé sur le fait que les CN phosphorylées se lient aux *nanoclusters* en croissance afin d'empêcher la calcification de la glande mammaire. Les queues de protéines sortant des nanoparticules s'associent à d'autres protéines à travers plusieurs types d'interactions faibles pour former une matrice protéique plus ou moins homogène. Nous utilisons explicitement les interactions faibles comme un terme collectif pour les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène, les liaisons ioniques, les interactions électrostatiques faibles et d'autres facteurs (sont exclues les interactions fortes engendrées par le phosphate de calcium) conduisant à l'auto-association. Tout comme dans le cas des micelles de β -CN pure et de κ -CN pure, l'association est très coopérative et trouve son origine dans les interactions faibles. En fait, l'interaction entre une paire de molécules de β -CN (comme suggéré dans le modèle à dualité des liens) est défavorable. Ce n'est que si un plus grand nombre de protéines interagissent simultanément que l'interaction devient thermodynamiquement favorable. L'hétérogénéité des protéines de la CN pourrait être considérée comme une indication de l'hétérogénéité des interactions faibles. C'est la coopérativité ou la multiplicité des interactions qui conduit à une micelle de CN. Invariablement, ces études suggèrent que la κ -CN limite le processus d'auto-association conduisant à la stabilisation de la micelle de CN native (de Kruif et Holt 2003; Holt 2004).

- Modèle à dualité des liens

Ce modèle a été utilisé pour prédire les propriétés comportementales de la micelle dans le lait liquide où, en considérant la rhéologie des laits à haute concentration. L'approche colloïdale de la sphère dure est un cas spécial limité au lait de concentration et de pH normaux. La nécessité d'une approche à dualité des liens est ensuite démontrée avec force dans sa capacité à fournir des explications mécanistiques complètes du comportement observé dans l'emprésurage, la gélification acide et la déstabilisation induite par l'alcool du lait écrémé. La mobilité des liaisons est identifiée comme un facteur crucial, mais la localisation de la liaison est également importante (Horne 2008). Horne (1998, 2002) a suggéré que le pontage à travers les nanoparticules de phosphate de calcium peut former une voie de polymérisation particulière dans son modèle de liaison double de l'assemblage et de la structure de la micelle de CN. La deuxième voie de polymérisation se fait par liaisons intermoléculaires des séquences hydrophobes, en traitant les molécules de CN comme des copolymères séquencés comme décrit ci-dessus. Dans ce modèle, la α_{S2} -CN est visualisée comme une molécule combinée de β -CN et de α_{S1} -CN, comme l'exige la distribution de résidus hydrophobes le long de sa séquence

(Figure 1.12). La liaison se produit entre les régions hydrophobes, représentées par des barres rectangulaires, et par la liaison de régions hydrophiles contenant des clusters de phosphosérines à des groupes de phosphate de calcium colloïdal (PCC). Les molécules de κ -CN limitent la croissance micellaire.

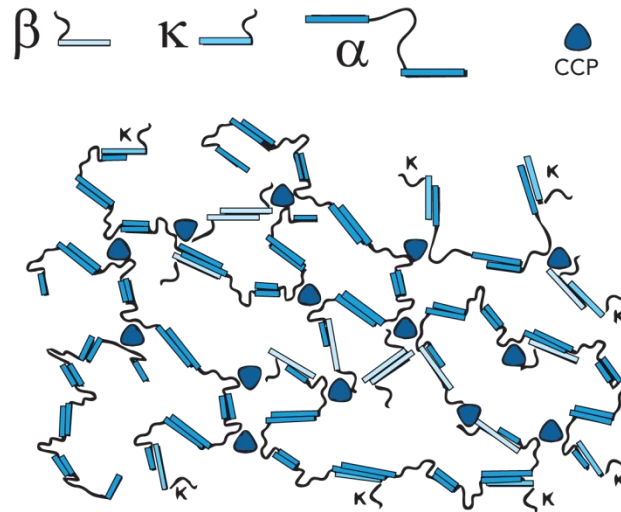


Figure 1.12. Représentation de la structure à dualité des liens. Adapté de (Horne 1998).

3.3. La déstabilisation des micelles de CN

Les CN sont souvent considérées comme des molécules très hydrophobes. Cependant, l'examen de la composition en acides aminés indique qu'ils ne le sont pas particulièrement. En fait, certains sont plus hydrophiles que la β -lg. Cependant, les CN ont une hydrophobicité de surface élevée; contrairement aux protéines de lactosérum globulaires que les résidus hydrophobes sont enfouis autant que possible dans la molécule, la plupart des résidus hydrophiles étant exposés à la surface. Dans le cas des CN, en raison de l'absence relative de structures secondaires et tertiaires, cet arrangement n'est pas possible, et donc les résidus hydrophobes sont très exposés (Fox et al. 2015a). Une autre caractéristique importante de la CN est sa tendance à précipiter. En raison de la nature complexe des espèces caséiques et des micelles qui en sont issues, la précipitation peut être provoquée par de nombreux agents tels que les acides et les sels. Lorsque le lait est acidifié, la structure de la micelle de CN est déstabilisée par solubilisation du PPC (Dalglish et Law 1989). La forme générale des micelles est maintenue après enlever le phosphate de calcium par l'acidification, mais leurs propriétés de diffusion et leurs structures (micrographies cryo-TEM) sont largement modifiées reflétant ainsi la perte des nanostructures de PCC (Marchin et al. 2007).

La dissociation et le réassemblage de la CN sont déterminés par des facteurs environnementaux, y compris le pH. Cette caractéristique des micelles de CN est largement explorée pour lier et délivrer divers nutraceutiques hydrophobes (peu solubles dans l'eau). Ainsi, les micelles de CN ont été utilisées pour lier certains composés tels que la curcumine, les catéchines de thé, β -carotène et le ritonavir, entre autres (Pan et al. 2014; Corzo-Martínez et al. 2015).

3.3.1. *L'hydrolyse enzymatique des micelles de CN*

La présure hydrolyse le lien peptidique (Phe105-Met106) de l'extrémité hydrophile C-terminale de la κ -CN, ce qui permet la libération de la paracaséine κ (fragment 1-105) et du caséinomacropéptide (fragment 106-169; CMP) et entraîne une réduction du potentiel zêta de -25 mV à -11 mV. Cette réduction du potentiel zêta, combinée à l'augmentation de la concentration en ions calcium (Ca^{2+}) et la formation de liaisons hydrophobes entre les CN crée un coagulum d'une grande cohésion et fermeté. La β -CN est également plus facilement hydrolysée par diverses protéases. L'hydrolyse de la β -CN en γ -CN et en peptides engendre un faible rendement fromager, dû à la perte de protéines et de peptides dans le lactosérum. L'hydrolyse de la β -CN peut également entraîner la formation de peptides amers, provoquant des problèmes de saveur dans le fromage.

3.3.2. *L'effet de la température*

La température est un facteur qui va influencer la cinétique d'interaction chimique de la micelle de CN. Une augmentation de la température va augmenter les énergies d'activation et la réfrigération va les diminuer. Les interactions hydrophobes de la β -CN à la réfrigération vont s'affaiblir, provoquant un relargage de la β -CN de la micelle diminuant ainsi sa taille et son potentiel zêta (McMahon et al. 2009; Post et al. 2012).

Les divers traitements thermiques appliqués au lait en industrie, tels que la pasteurisation et la stérilisation, peuvent également avoir des effets dénaturants sur les protéines du lait mais pas directement sur les CN. Les études réalisées sur la micelle de CN montre que la température a un effet sur leur aptitude à la coagulation des laits chauffés par une hydrolyse enzymatique incomplète, une concentration réduite en calcium sérique suite à la précipitation du phosphate de calcium et la stabilisation de la micelle de CN grâce au recouvrement avec des protéines sériques dénaturées chargées positivement (Vasbinder et al. 2003).

3.3.3. *La modification de la force ionique*

La concentration en sels minéraux du lait, principalement en Ca^{2+} , va affecter la coagulation de la micelle de CN. En effet, le temps de prise diminue tandis que le taux de raffermissement et la fermeté du gel vont augmenter avec l'addition de CaCl_2 . Ce sel va provoquer des interactions entre les micelles de CN par suppression des répulsions électrostatiques et, diminution drastique du potentiel zêta (Dalglish 1984). L'addition de NaCl, pour sa part, augmente la force ionique et cause une déminéralisation de la micelle ce qui réduit la charge nette négative sur les micelles de CN et le pH du lait, mais n'influence pas significativement la taille moyenne des micelles de CN (Huppertz et Fox 2006). L'élimination du calcium par un agent complexant (EDTA) provoque la désagrégation des micelles de CN modifiant ainsi la taille du colloïde (Cayot et Lorient 1998b).

3.3.4. *Ajout d'éthanol*

En présence d'éthanol, les micelles de CN sont déstabilisées (Horne 2016). Ceci est engendré par la fonction de l'alcool qui réduit la constante diélectrique provoquant un effondrement de la région C-terminale en forme de brosse de la κ -CN sur la périphérie de la micelle de CN. Avec la structure réticulaire ouverte proposée pour McMahon et Oommen (2008), ce changement de la constante diélectrique serait connu pour un nombre conséquent de protéines. Cela déclencherait une contraction globale et un réarrangement provoquant un effondrement et une dissociation partielle des CN. L'augmentation des forces répulsives entre les CN et la qualité du solvant peuvent entraîner la dissociation des micelles lorsqu'elles sont chauffées en présence d'éthanol. Horne et Davidson (1986) ont attribué cette dissociation des CN au développement important de structures d'hélices dans les CN en présence d'alcools.

3.3.5. *Ajout d'acides*

Au point isoélectrique (pI), les charges positives et négatives vont s'annuler conduisant ainsi à une solubilité minimale des protéines (Figure 1.13). Comme expliqué précédemment, une diminution du pH du lait à 4,6 fait intervenir un ensemble de réactions engendrant la précipitation des CN et la formation d'un caillé (Cayot et Lorient 1998a; Mcsweeney et Fox 2013). Avec l'acidification, l'agrégation se produit à toutes les températures. À des températures plus basses, d'environ à 6°C, les agrégats formés sont très fins et restent en suspension avec le temps mais peuvent être sédimentés par centrifugation à basse vitesse. À des températures plus élevées, entre 30 à 35 °C, les agrégats sont

plus grossiers et précipitent rapidement dans la solution. À des températures davantage élevées, de l'ordre de 45 °C, les agrégats sont très compacts et difficiles à manipuler.

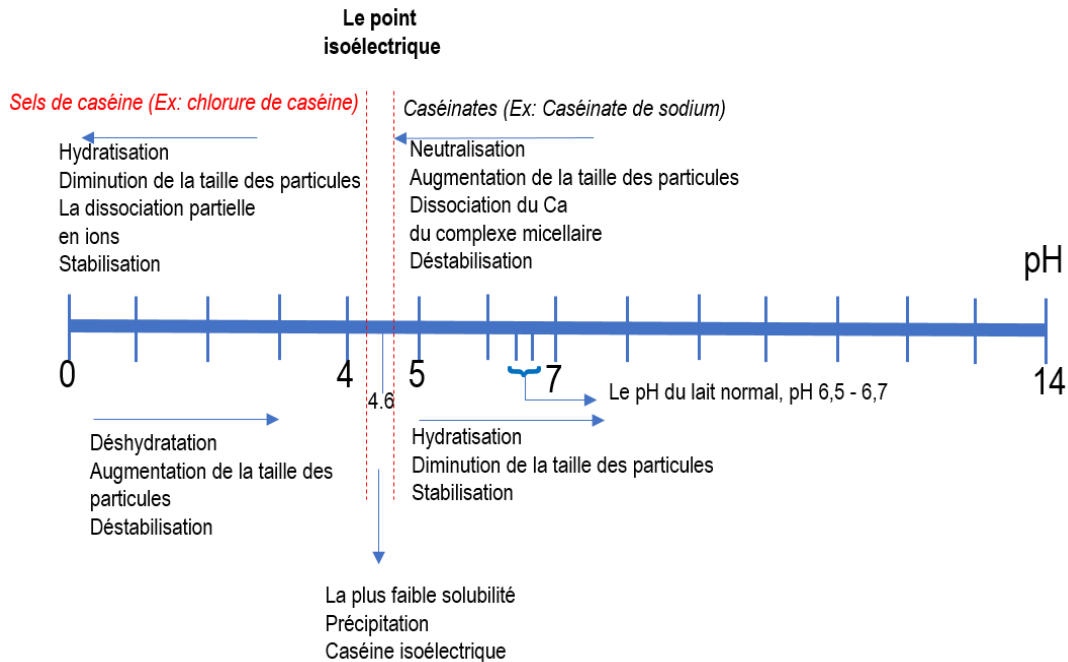


Figure 1.13. Les influences sur la micelle de CN en trois étapes simplifiées par un acide (Adapté de Bylund et al. 2015).

La précipitation isoélectrique de la CN est d'une importance industrielle majeure puisqu'elle permet la production de CN isoélectriques et de caséinates, de produits laitiers fermentés et de fromages frais coagulés (Mcsweeney et Fox 2013). Pour éviter la coagulation de la CN à pH plus acide, dans la recherche laitière, de nombreuses études ont observé l'interaction de certains stabilisants avec les CN dans les produits laitiers acidifiés. Ces stabilisants évitent la floculation des protéines du lait et la séparation macroscopique subséquente du lactosérum (Figure 1.14). Du point de vue du consommateur, les laits acidifiés doivent être aussi visuellement homogènes que le lait.

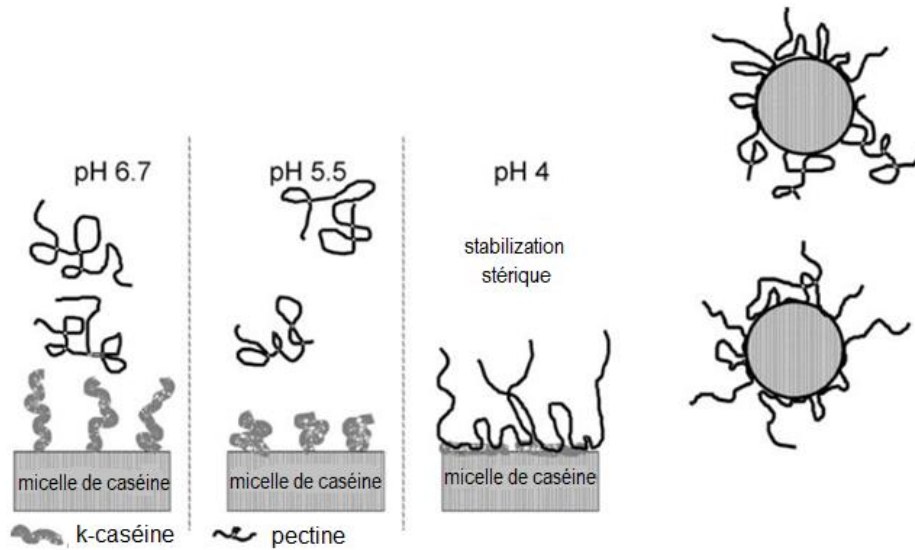


Figure 1.14. Représentation schématique du « remplacement » de la κ -CN par la pectine lors de l'abaissement du pH, et des micelles de CN « revêtues » de molécules de pectine adsorbées. (Adapté de Tromp et al. 2004)

Ainsi, d'un point de vue fondamental et appliqué, l'étude de nouvelles stratégies visant à modifier les propriétés physico-chimiques des micelles de CN est d'un grand intérêt. Plusieurs études ont déjà démontré de telles propriétés pour diverses espèces peptidiques. Cependant, à notre connaissance aucune étude n'a porté sur le Pf1-8 issu de l'hydrolyse trypsique de la β -lg. En effet, il est possible d'engendrer des interactions spécifiques entre ce peptide et les micelles de CN du fait du fort caractère hydrophobe de ce peptide et des espèces hydrophobes composant les micelles de CN (β -CN).

CHAPITRE 2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

1. Hypothèse de recherche

Le peptide β -lg f1-8, généré après hydrolyse trypsique de la β -lactoglobuline, interagit avec les caséines et modifie leurs propriétés structurales et physico-chimiques.

2. Objectifs

L'objectif général de ce projet est d'évaluer les modifications structurales et physico-chimiques de la micelle de CN en présence de différentes concentrations en Pf1-8. Plus spécifiquement, et afin de répondre à l'hypothèse formulée, deux objectifs spécifiques ont été proposés :

1. Étudier l'effet du ratio CN et peptide β -lg f1-8 sur la solubilité de la micelle en fonction du pH.
2. Évaluer le profil d'interaction protéique entre les micelles de CN et le peptide β -lg f1-8 et caractériser les espèces caséiques affectées.

**CHAPITRE 3. MODIFICATIONS PHYSICOCHIMIQUES DE LA CASEINE
MICELLAIRE APRES INTERACTION AVEC LE PEPTIDE F1-8 GENERE
APRES HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA BETA-LACTOGLOBULINE**

PHYSICOCHEMICAL MODIFICATIONS TO MICELLAR CASEIN IN THE PRESENCE OF THE F1-8 PEPTIDE GENERATED BY TRYPTIC HYDROLYSIS OF BETA-LACTOGLOBULIN

Raquel Silveira Porto Oliveira, Alice Marciniak, Shyam Suwal, Alain Doyen and Yves Pouliot*

Department of Food Sciences, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Dairy Research Centre (STELA), Université Laval, Québec, Québec, G1V 0A6, Canada

*Corresponding author. Tel.: +1 418-656-5988; fax: +1 418-656-3353.

E-mail address: yves.pouliot@fsaa.ulaval.ca

1. Résumé

Le peptide f1-8 (Pf1-8) obtenu par hydrolyse trypsique de la β -lactoglobuline (β -lg) a démontré plusieurs caractéristiques d'intérêt. En effet, outre sa capacité d'auto-assemblage et son caractère hydrophobe, il fait partie d'un groupe de peptides (tels que les peptides f9-14, f15-40, f142-148 de la β -lg) ayant la capacité de se lier à certaines protéines de lait (comme la β -lg et l' α -la) et de modifier le profil de dénaturation thermique, probablement par des interactions hydrophobes avec le noyau hydrophobe de la β -lg. Les caséines (CN) représentent à elles seules près de 80% de la totalité des protéines de lait bovin. Leur acidification à pH 4,6 provoque des changements structuraux majeurs dans la micelle et induit leur précipitation au voisinage du point isoélectrique. L'objectif de cette recherche était de caractériser les changements dans les propriétés physicochimiques de la CN micellaire en présence du peptide Pf1-8. Ce peptide a été produit par hydrolyse trypsique d'un isolat de protéine de lactosérum, isolé par ultrafiltration (UF), concentré par osmose inverse (OI) et purifié par lavage à l'eau et par centrifugation (pureté de 91%). Différentes solutions modèles (pH 6,6) avec des ratios CN: Pf1-8 de 1: 1, 5: 1 et 10: 1 (concentrations respectives de 2,5: 2,5, 2,5: 0,5 et 2,5: 0,25 mg / mL) ont été testées. Pour chaque solution, la solubilité de la CN, la taille par SEC-HPLC et l'interaction des protéines par SDS-PAGE ont été déterminées à différents pHs allant de 6,6 à 2,6. Aucune précipitation de CN n'a été observée dans toute la plage de pHs testée pour la solution à un rapport de 1: 1. Cependant, pour des échantillons à un ratio de 10: 1 et 5: 1 de CN: Pf1-8, la précipitation a été observée à pH 4,6. Les analyses par SDS-PAGE et SEC-HPLC ont démontré la formation d'agrégats impliquant Pf1-8 et un ou plusieurs CN pour tous les pHs testés, et une augmentation de la solubilité et une diminution de la taille. Par conséquent, nos résultats démontrent que le peptide Pf1-8 peut modifier les propriétés physicochimiques de la CN, représentant ainsi un stabilisant potentiel des protéines dans les formulations laitières.

Mots-clés: Peptide f1-8; caséines micelles, interactions, taille.

2. Abstract

The peptide f1-8 (Pf1-8) obtained by tryptic hydrolysis of β -lactoglobulin (β -lg) has demonstrated several characteristics of interest. Indeed, in addition to its capacity for self-assembly and its hydrophobicity, it is part of a group of peptides (such as peptides f9-14, f15-40, f142-148 of β -lg) having the ability to bind to some milk proteins (such as β -lg and α -la) and change the thermal denaturation profile, probably by hydrophobic interactions with the hydrophobic core of β -lg. Caseins (CN) alone account for nearly 80% of the total bovine milk protein. Their acidification at pH 4.6 cause major structural changes in the micelle and are precipitated in the vicinity of isoelectric point. The objective of this work was to characterize the changes in the physicochemical properties of micellar CN in the presence of peptide Pf1-8. This peptide was produced by tryptic hydrolysis of a whey protein isolate, isolated by ultrafiltration, concentrated by reverse osmosis and water washed by centrifugation to purify (91% purity). Different model solutions (pH 6.6) with CN:Pf1-8 ratios of 1:1, 5:1 and 10:1 (respective concentrations of 2.5:2.5, 2.5:0.5, and 2.5:0.25 mg/mL) were tested. For each solution, the solubility of the CN, size by SEC-HPLC, and protein-interaction by SDS-PAGE were determined at various pHs ranging from 6.6 to 2.6. No CN precipitation was observed in the whole range of pH tested for the solution at 1:1 ratio. However, for samples at ratio 10:1 and 5:1 of CN:Pf1-8, the precipitation was observed at pH 4.6. Analyses by SDS-PAGE and SEC-HPLC demonstrated the formation of aggregates involving Pf1-8 and one or more CNs for all tested pHs, and increase in the solubility, and decrease in the size. Consequently, our results demonstrate that Pf1-8 peptide can modify the physicochemical properties of CN thus representing as a potential protein stabilizer in dairy formulations.

Key Words: Peptide f1-8; caseins micelles, interactions, size.

3. Introduction

Bovine milk contains approximately 3.6% (w/v) of protein. CN and whey proteins correspond to 80% and 20% of total proteins in milk, respectively. The bovine milk whey fraction contains three major proteins, β -lactoglobulin (β -lg), α -lactalbumin (α -la), and bovine serum albumin (BSA) at 50, 20 and 10%, respectively (Cayot et Lorient 1998a; Fox et al. 2015b).

The major protein in whey *i.e.* β -lg, is found as a dimer at the pH of milk (\sim 6.7) (Sawyer 2013) in a globular conformation. This protein has been used to produce peptides by enzymatic hydrolysis, mainly by human digestive enzymes (trypsin, chymotrypsin and pepsin) (Turgeon et al. 1992; Dufour et al. 1995; Van Willige et Fitzgerald 1995; Stapelfeldt et al. 1996). Some peptides of β -lg have been studied for their functional (foaming and emulsification) and some for bioactive (antihypertensive, antimicrobial, anticancer, etc.) properties. Several studies have also demonstrated that certain peptides derived from the enzymatic hydrolysis of β -lg can self-assemble to form specific structures called nanofibers, nanotubes, hydrogels and spherical nanoparticles (Haines-Butterick et al. 2007; Ulijn et Smith 2008). More specifically, the peptide, Pf1-8, obtained by tryptic hydrolysis of β -lg (Pouliot et al. 2009) demonstrated several characteristics of interest, like the self-assembly to form nanofiber and hydrogel structures (Guy et al. 2011; Guy et Voyer 2012). Bovine milk CN generally comprises of four proteins namely α s1- (38%), α s2- (10%), β - (40%), and κ -CN (12%). In the milk, CN exhibit a quaternary structure stabilized by calcium phosphate bonds also known as micelles (Eck et Gillis 2006; De Kruijff et al. 2012; Mcsweeney et Fox 2013; Bylund et al. 2015).

One important characteristic property of CN is its sensitivity to specific agents. Due to the complex nature of the CN molecules, and that of the micelles, their precipitation can be caused by many different agents like acids and salts. When the milk is acidified, the colloidal calcium phosphate in the CN micelles is more soluble (Dalglish et Law 1989), but the negative charges associated with the cross-linking phosphoserine groups are also titrated away during acidification, and the solvency of the external layer of κ -CN is progressively reduced. The hydrophobic bonds strength can be increased if carboxyl charges are also neutralized. The integrity of the micelles is maintained but their scattering behavior and their appearance in cryo-TEM micrographs reflect the loss of the colloidal calcium phosphate nanoclusters (Marchin et al. 2007). The dissociation and reassembly of SN are affected by environmental factors, including pH. This characteristic of CN micelles is widely explored to bind and

deliver various hydrophobic nutraceuticals (sparingly soluble in water). These CN micelles modification have been used to non-specifically bind vitamin D₂, curcumin, tea catechins, β -carotene, and ritonavir (Pan et al. 2014; Corzo-Martínez et al. 2015).

A number of studies have shown the positive impact of interactions of stabilizer with CN in acidified milk products. Pectin is one of the most widely used stabilizers which can prevent aggregation of CN micelles at acidic pH. These phenomena are the results of various interactions between pectin and proteins. Firstly, pectin can increase the steric repulsion between the CN, thus preventing flocculation. Alternatively, it can impose a kinetic barrier against extensive aggregation. The outcome depends on whether the pectin molecules are adsorbed onto the CN particles or not. The studies showed that the complexes of pectin and CN micelles are formed only at lower pH. Ambjerg Pedersen and Jørgensen (1991) proposed that the binding of pectin to the CN micelle is of electrostatic nature, as the binding is pH dependent. Some studies found that pectin molecules are adsorbed to the surface of the CN micelles and acts as a dispersing agent. Its stabilizing effect cannot be explained by electrostatic repulsion, but presumably by steric stabilization i.e. by adsorbing the pectin molecules onto the colloidal particles (Parker et al. 1993). Several studies have shown that the presence of specific peptides could modify the functional properties of proteins such as gelling, in various food matrices. Indeed, in addition to its self-assembly capacity and high hydrophobicity. Pf1-8 is part of a group of peptides (such as f9-14, f15-40, f142-148 of β -lg) having the ability to bind to the native β -lg. The interaction with such peptides and β -lg was found to modify the thermal denaturation profile (Barbeau et al. 1996) probably by hydrophobic interactions with the hydrophobic core of β -lg. Similarly, the Pf1-8 was found to interact with α -lactalbumin (α -la) by hydrophobic interaction and change the solubility of this protein in different pH without changing its thermal properties (Ratté 2013). These results show the possibility of Pf1-8 peptide to interact with other milk proteins, like the CNs.

Therefore, the objective of the present paper was to study the changes in physicochemical properties of CN in presence of Pf1-8 peptide. The effect of Pf1-8 peptide on protein solubility, peptide-protein interaction, and sizes were studied at various pH, ranged from 6.6 to 2.6.

4. *Materials and methods*

4.1. *Production, isolation and purification of peptide*

4.1.1. *Hydrolysis of β -lg*

The tryptic hydrolysate was prepared at a pilot scale as described by Chay Pak Ting et al. (2007). A WPI solution (10%, w/v) was prepared by dissolving 2.73 Kg of WPI powder in 22.27 Kg of distilled water containing 0.01 M CaCl₂ to stabilize the enzyme. The pH of the solution was adjusted to 8.0 with 4N NaOH and the temperature maintained at 37°C. The hydrolysis reaction was initiated by adding a solution of trypsin (10% w/v) dissolved in HCl 0.001 N. The chosen ratio of enzyme: substrate was 1:700 as experimented by Ratté (2013). Throughout the reaction, the pH of the solution was maintained at 8.0 with 4 N NaOH and the pH-stat method was used to monitor and achieve the degree of hydrolysis (DH) of 5.6% (del Toro et García-Carreño 2002). The enzymatic reaction was stopped by separating enzymes and unhydrolyzed proteins by ultrafiltration (UF) using Engineering Lab Unit 1812 system with a polysulfone membrane of 10 kDa. Filtration was carried out at 37 °C at a pressure of 4.5 bar during 4.5 hours. The permeate was then concentrated using reverse osmosis (RO) using engineering Lab Unit (Osmonics, Vista, CA) equipped with RO polyamide membrane of 300 Da with a pressure of 13.5 bar and at room temperature (25 °C) for 1.3 hours. After the RO, the peptide fraction known as complete tryptic hydrolysate (CTH) was freeze-dried.

4.1.2. *Isolation of Pf1-8*

The CTH was rehydrated in Milli-Q water at a concentration of 5% (w/v), centrifuged and then washed four times by centrifugation at 5000 × g for 12 min at 20 °C. The purified peptide was lyophilized and stored at -18 °C.

4.1.3. *Peptides profile by HPLC analysis*

The degree of purity of the f1-8 peptide after each washing step was calculated based on the area under the curve of the peak corresponding to the peptide relative to the total area of the chromatograms (Eq.1). It was determined by HPLC using an Agilent 1100 Series HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) The system was equipped with a UV-visible detector (model G1314A) at a wavelength of 214 nm, a degasser (model G1312A), a binary pump (model G1379A), an injector (model G1329A) and a column heater module (model G1330B). Data acquisition was analyzed using the ChemStation software (A.10.02 release, Agilent Technologies). The stationary phase was Luna C18 column (250 × 2 mm, Phenomenex, Torrance, CA). The mobile phase was consisted of the solvent A

(0.11% v/v trifluoroacetic acid (TFA) in water) and solvent B (90% v/v, acetonitrile (ACN); 10% v/v, water, and 0.10% v/v TFA). A volume of 20 μ L of sample at 2 mg/mL concentration was injected into the column at the elution rate of 0.2 mL/min. The elution of the components was carried out with a linear gradient of solvent B from 3 to 50% in 85 min, then to 100% in 105 min which was maintained for 10 min.

$$Pf1 - 8 \text{ purity (\%)} = \frac{\text{Area under the curve of peak corresponding to Pf1-8}}{\text{Sum of all peptide areas}} \quad \text{Eq.1}$$

4.2. Production of CN micelles

Casein micelles suspensions (purity of 85%) were prepared at a pilot scale by microfiltration of milk as described by Marciniak et al. (2018).

4.3. Experimental Design

For the preparation of working protein solutions, the peptide Pf1-8 was firstly solubilized for 1 h with agitation in Milli-Q water at pH 2. CN were solubilized in 0.2 M Tris-HCl buffer at pH 6.8 during 2h. Final concentration of CN and peptides was 2.5 mg/mL of each for the ratio of 1:1 of CN: Pf1-8 and pH was adjusted to 6.6. The concentration of CN was maintained at 2.5 mg/mL and peptide concentration was reduced to 0.5 and 0.25 mg/mL, to obtain the ratio of CN: Pf1-8 of 5:1 and 10:1 (table 3.1). A volume 30 mL of each solution was prepared at pH adjusted to 6.6.

Tableau 4.1. Ratio and concentration of protein solutions.

Ratio	Composition	Concentration
1:0	CN	2.5 mg/mL
0:1	Pf1-8	2.5 mg/mL
1:1	CN: Pf1-8	2.5:2.5 mg/mL
5:1	CN: Pf1-8	2.5:0.5 mg/mL
10:1	CN: Pf1-8	2.5:0.25 mg/mL

A volume of 10 mL of each solution was separated before pH change for further analysis: size exclusion chromatography, zeta-potential and particle size. The pH of the samples was decreased to 6.6, 5.6,

4.6, 3.6 and 2.6 using 1N HCl. The acidified samples were centrifuged at 11,000 x g, 20°C for 25 min to separate the precipitates according to the protocol of Huppertz et al. (2004). The supernatant, containing non-sedimentable proteins, was carefully recovered and stored at 4°C for further analyses.

4.4. Analysis

4.4.1. Particles size analysis

The CN micelle size was determined by photon correlation spectroscopy using a Malvern Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcs., UK) and the peptide and the solutions CN:Pf1-8 size were determined by Mastersizer Nano 3000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K) equipped with Hydro SV dispersion unit. Refractive index and absorption were set at 1.45 and 0.001 respectively. All size measurements (n = 3) were performed using a 90° scattering angle at 25 °C with 180 s of recording. The solutions were diluted with the buffer with water at pH 2 (3:1) to just the obscuration in was kept near to 15%.

4.4.2. Zeta Potential

The samples (at pH 6.6) were analyzed by Zetasizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., UK). The zeta potential was measured as described by Narong and James (2006). This instrument measures the electrophoretic mobility and the zeta potential of the particles in the solution using Laser Doppler velocimetry (LDV). The zeta potential was measured using an aqueous dip cell in the automatic mode. The signal recorded by the equipment was converted to zeta potential according to Henry's equation (eq. 2):

$$\zeta = \frac{3U_E\eta}{2\epsilon f(\kappa a)} \quad \text{Eq. 2}$$

The samples (at pH 6.6) were analyzed by Zetasizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., UK). The zeta potential was measured as described by Narong and James (2006). This instrument measures the electrophoretic mobility and the zeta potential of the particles in the solution using Laser Doppler velocimetry (LDV). The zeta potential was measured using an aqueous dip cell in the automatic mode. The signal recorded by the equipment was converted to zeta potential according to Henry's equation.

4.4.3. *Size-exclusion Chromatography*

The CN and/or peptide solution at different ratio were analyzed by SEC-HPLC (1100 Series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The system was equipped with a UV-visible detector (model G1314A) at a wavelength of 214 nm, a degasser (model G1312A), a binary pump (model G1379A), an injector (model G1329A) and a column heater module (model G1330B).

Data were acquired using the Agilent open lab software (A.01.08.108 release, Agilent Technologies). The stationary phase was ENrich SEC 650 column (10 x 300 mm, Bio-Rad, Hercules, USA). The mobile phase was PBS (phosphate-buffered saline). The samples were analyzed according to their concentration of 2.5-5.0 mg/mL, then a volume of 75 μ L was injected into the column and run at the flow rate of 0.2 mL/min for 60 min. The peaks were detected at a wavelength of 214 nm. Molecular sizes were determined by retention time using a lyophilized standard filtration gel containing a mixture of thyroglobulin (670,000 Da), bovine globulin (158,000 Da), hen ovalbumin (44,000 Da) of equine myoglobin (17,000 Da) and vitamin B12 (1,350 Da) of Bio-rad (Hercules, California, USA).

4.4.4. *Protein profile analysis by SDS-PAGE*

Protein profiles in peptide-protein samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Electrophoresis was performed using Bio-Rad mini-protean TGX precast gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) containing 12% acrylamide. Twenty microliters of each sample were added to 1 μ L of β -mercaptoethanol and 19 μ L of 2x Laemmli sample buffer (prepared with 65.8 mM TrisHCl, pH 6.8, 2.1% SDS, 26.3% [w/v] glycerol, 0.01% bromophenol blue). The samples were thawed, heated to 100°C in boiled water, held at 100°C for 5 min and immediately cooled on ice. The molecular weight markers from Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were used. The running buffer was prepared by adding 100 mL of 10x Tris/Glycine/SDS Buffer to 900 mL of deionized water. All samples were loaded into the gel wells and migrated at 15 mA until the dye front reached the reference line. After electrophoresis experiments, the gels were stained for 60 min with Coomassie blue solution composed of 1 g of Coomassie Blue in 10% acetic acid, 40% ethanol, and 50% deionized water. Finally, the gels were destained overnight in a 10% methanol, 10% acetic acid, and 80% deionized water solution. All gels were imaged using the stain-free ChemiDoc MP (Bio-Rad) imager immediately after the protein separation. The ImageLab software version 4.1 (Bio-Rad) was used to determine the background-subtracted intensity of the bands in all the gels. For background subtraction, a value of 1 was used

while imaging the gel and blot images for the total protein measurements from the lanes, while for the film and imager data acquired from the chemiluminescent blots, a rolling disc between 10 and 25 was used to ensure a consistent peak cutting for densitometric analysis.

4.5. Statistical analysis

The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) of SAS University Edition version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). And where F test was significant at $p < 0.05$, the least significant difference (LSD) test were used to compare the means. All samples were prepared in triplicate and ($n=3$) and analyses were conducted at least in triplicate ($n=3$) and the results were reported as the mean \pm standard deviation (SD).

5. Results

5.1. Peptides profiles of precipitate washed

To isolate the peptide Pf1-8 from the complete tryptic hydrolysate (CTH), the method was based on the aggregation and insolubility of the peptide in water as previously discussed by Pouliot et al. (Pouliot et al. 2009). Figure 3.1 shows the RP-HPLC chromatograms of the CTH and after different washing steps. The subsequent washing with water and centrifugation was found to be efficient to a single peptide, the Pf1-8, with a high purity level. After 5th round of washing, the purity of Pf1-8 was found to be $>91\%$, according to equation (Eq1) calculated based on the area under the curve of the peak corresponding to the peptide relative to the total area of the chromatograms. The purity of the peptide is comparable to that observed by Pouliot et al. (Pouliot et al. 2009) who obtained about 94% of purity after two times washing. Given the high degree of purity of the peptide Pf1-8, the protocol was followed to prepare the peptide a larger quantity and freeze-dried for further experiment.

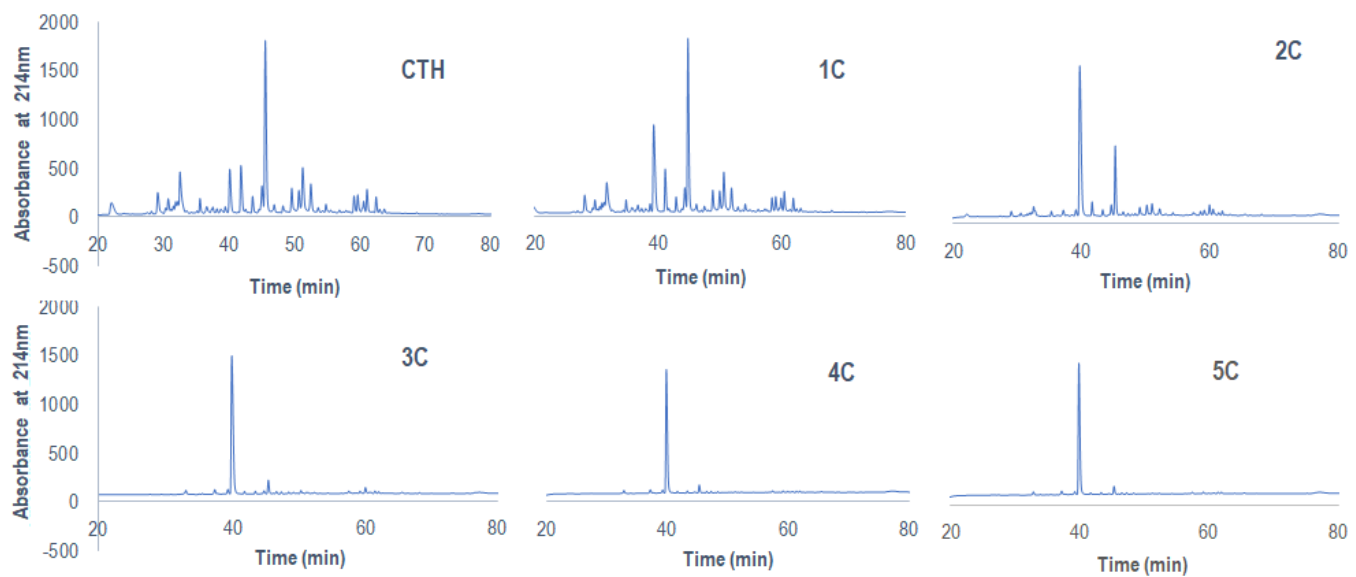


Figure 3.1. HPLC chromatograms of complete tryptic hydrolysate, CTH (a) and subsequent washing steps, first (b) second (c), third (d), fourth (e) and fifth (f).

5.2. *Visual observation*

The solubility of different CN: Pf1-8 ratio mixture at different pH was determined visually (Figure 3.2). As expected, the CN suspensions were found to be more turbid at the pH value of 4.6 and below. Moreover, the sample containing only the peptides was found to be slightly cloudy apparently the same at all pH tested (pH 6.6 to 2.6). It has been known that the peptide fraction is insoluble above the pH of 2 up to 12 (Pouliot et al. 2009). Interestingly, turbid apparently of CN was observed in the pH range of 4.6 to 2.6 in the sample containing CN: Pf1-8 at the ratio of 1:1 (figure 3.2e). Furthermore, it was seen that the higher the peptide concentration of the solutions, the more likely the CN solubility. However, it has been observed that more the ratio CN: Pf1-8 was high, more the solution behave as CN alone. Indeed, in both solutions 5:1 (figure 3.2d) and 10:1 (figure 3.2c) we can observe a higher turbidity for solutions at pH<4.6 than pH>4.6. Furthermore, the change in appearance was relatively less intense for the sample with CN: Pf1-8 ratio of 5:1 as compared to that of higher ratio (10:1). Therefore, the Pf1-8 appears to affect the dissociation of CN micelles depending on its concentration.

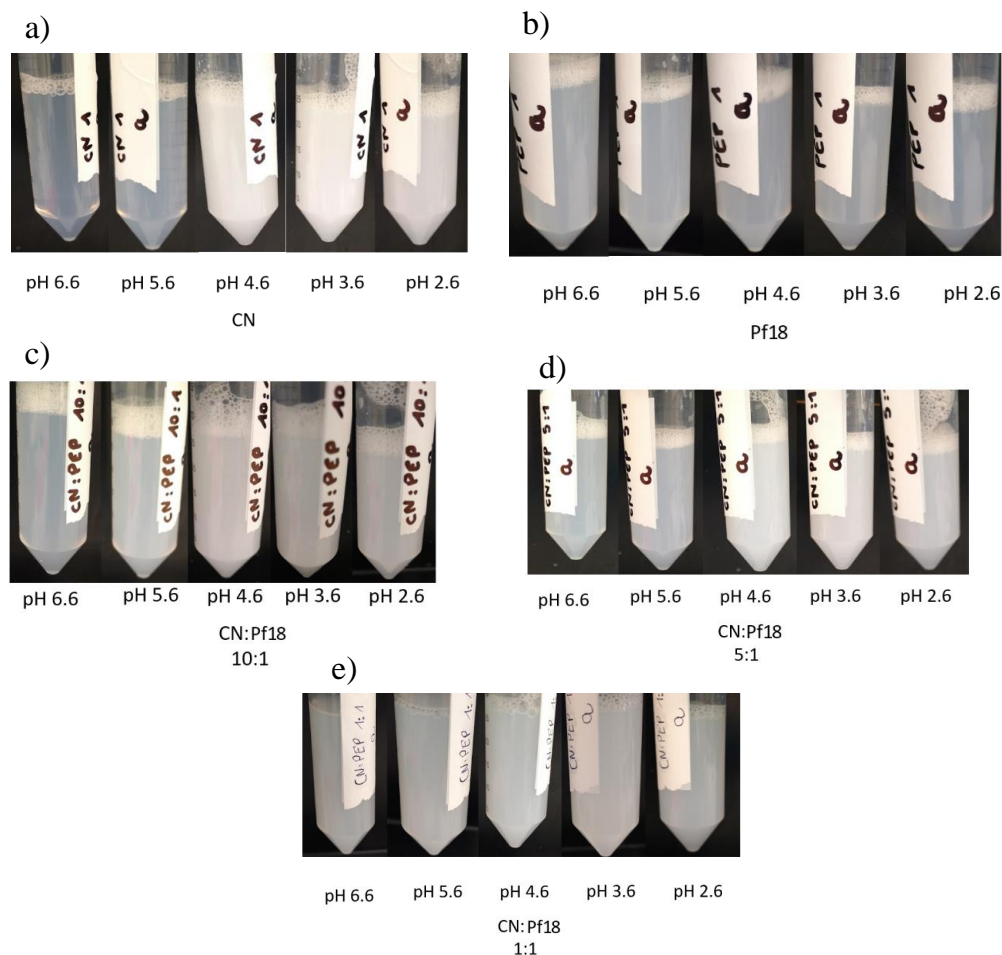


Figure 3.2. Visual appearance of the solubility of micellar CN as a function of pH and Pf1-8 concentration (a: pure CN, b: pure Pf1-8, c-e: CN-Pf1-8 at ratio 10:1, 5:1 and 1:1, respectively).

5.3. Effect of Pf1-8 concentration on the particle size distribution and ζ -potential of CN micelles.

Figure 3.3 and 3.4 respectively shows the particle size of the particles (μm) and the zeta potential of the CN and Pf1-8 solutions alone as well as CN: Pf1-8 mixtures of the 1: 1; 5: 1 and 10: 1 ratios at the initial pH of the solution (about 6.6). Concerning Figure 3.3, the largest size of the aggregates being observed at the ratio 5:1 ($79.80 \pm 3.51 \mu\text{m}$) and significantly different ($P < 0.05$) from the others. The size of 1:1 ($31.83 \pm 3.25 \mu\text{m}$) was not significantly different ($P > 0.05$) from the 10:1 ($28.23 \pm 2.10 \mu\text{m}$) and Pf1-8 alone ($34.20 \pm 2.06 \mu\text{m}$), however, these last were significantly different ($P < 0.05$) between them. Compared with CN alone, all the samples are larger average particle diameter ($P < 0.05$). So, it can be mentioned that the peptide has formed aggregates due to these larger values.

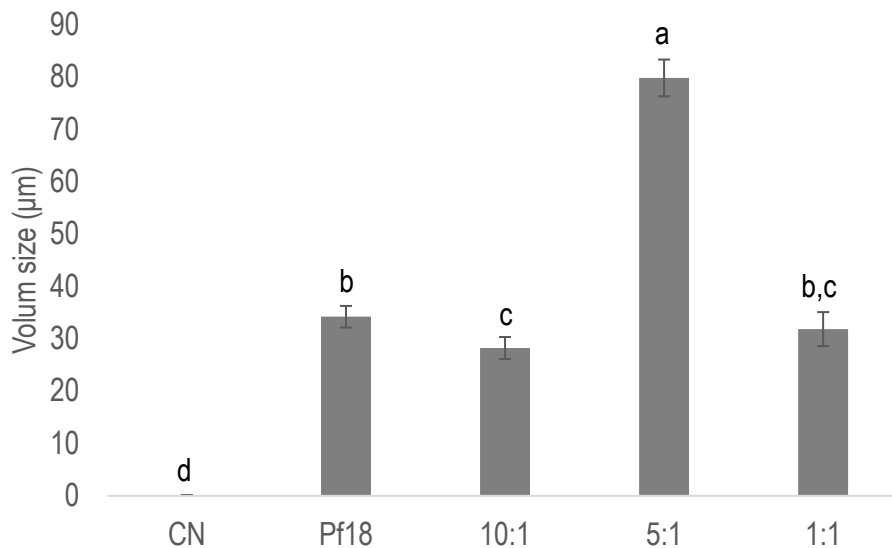


Figure 3.3. Effects of the concentration of Pf1-8 (ratios 1:1 to 10:1) on the particle size distribution of CN. Particle size distributions of pure Pf1-8 and CN were also given. Each bar represented the mean of triplicate readings. Values within rows with different letters are significantly different in LSD test ($P < 0.05$) at a given parameter.

The zeta potential analyses of peptide/protein solutions showed that all the samples possess a net negative charge on the surface at pH 6.6 ranging for peptide alone and all CN:peptide mixture (Fig.3.4). The net surface charge of CN (-6.97 mV) was modified in the presence of peptides which turned more negative. However, the value of zeta potential decreased from -7.60 mV for 1:1 to -10.63 and -11.01 mV for 5:1 and 10:1, respectively. The value of zeta potential of CN micelle was lower than stated in literature (REF).

The surface charge decreased gradually with the decrease of peptide concentration with -10.63 ± 0.75 and -11.01 ± 0.24 mV, respectively for ratio of 5:1 and 10:1 and were significantly lower ($P < 0.05$) than 1:1 (-7.6 ± 0.49 mV) and CN alone (-6.97 ± 0.62 mV). However, the both last samples were not significantly different between them. Lastly, all samples showed a lower surface charge ($p < 0.05$) comparatively to Pf1-8 alone (-3.11 ± 0.29 mV). Globally, the peptide decreases the ζ -potentials values of the CN at pH 6.6, but surprisingly, this value appears to be inversely proportional to the decrease of Pf1-8 concentration.

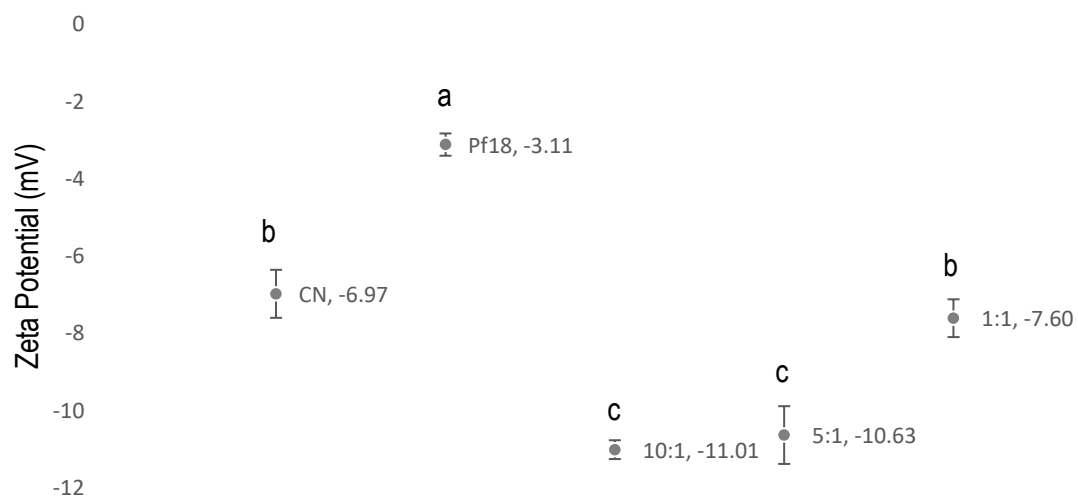


Figure 3.4. Effects of the concentration of peptide on the zeta-potential of CN. Each point represented the mean of triplicate readings. Values within rows with different letters are significantly different in LSD test ($P < 0.05$) at a given parameter.

5.4. Effect of the concentration of Pf1-8 and CN in the aggregates size obtained by SEC-HPLC

The Pf1-8 supernatants from pH 6.6 to 2.6 show similar patterns with a single major peak (low molecular weight (LMW) molecule) observed indicating no loss of peptide relating to pH decrease. These results are towards what was observed on Figure 3.2. Indeed no difference in solution turbidity was noticed for the whole pH range showing no impact on peptide solutions. In addition, the main peak exhibit a higher intensity for supernatant at pH 2.6 indicating the better solubility of the peptide for low pH (Guy et al. 2011). Regarding the solutions of CN alone (Figure 3.5), large aggregates of high molecular weight (HMW) were present on supernatants at pH > 4.6; nevertheless, no proteins were observed in supernatants for solutions at pH < 4.6 confirming the precipitation of proteins under this pH value. As expected and evidenced earlier in Figure 3.2, the decrease in pH (< 4.6) leads to the precipitation of CN.

Interestingly, the combination of peptide and CN (1:1) leads to a radical change in chromatogram profile (in comparison with peptide and CN alone). However, the chromatograms, both in terms of profile or intensity, were practically unmodified at different pH range. For this sample, a peak corresponding to LMW molecule was observed, which was also present in peptide alone (retention time: 23.6 min). Nevertheless, no trace of HMW molecule observed for the samples containing CN and peptides even at pH > 4.6. While peptide and CN alone exhibited respectively LMW and HMW molecules, the combination of both leads to a real change of profile. These results suggest a complete dissociation of the CN micelle when combined with peptide. For samples with a 1: 1 ratio, the profiles are globally superimposable for all pHs.

When concentration of peptides relative to CN were decreased for both ratio (5:1 and 10:1), intermediate profiles were observed. As a matter of fact, HMW molecules from CN are observed for both samples at pH > 4.6, and LMW molecules from peptide are detected in the whole range of pH. These results are in accordance with visual observation in the Figure 3.2. Indeed, for these samples we observed chromatogram profiles showing both CN and peptide alone.

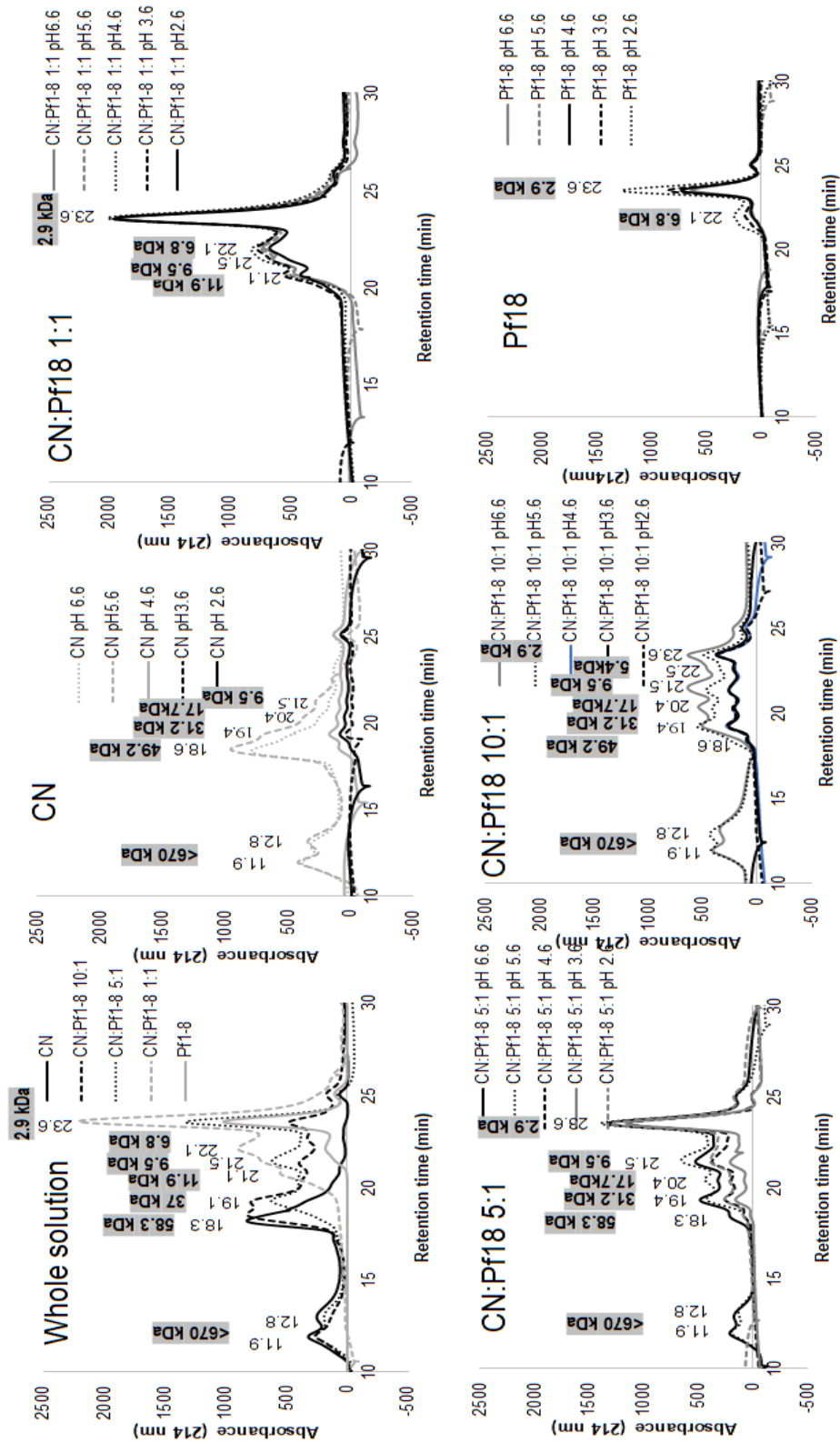


Figure 3.5. Molecular weight profiles of CN: Pf1-8 solutions obtained by SEC-HPLC as a function of pH and Pf1-8 concentration.

5.5. Protein profile

The composition of soluble proteins has been determined by the SDS-PAGE and molecular weight profiles of the supernatants were given for all CN: Pf1-8 ratio at pH 6.6 to 3.6 (Figure 3.6). As expected and because of its very low molecular weight (< 10kDa, the limit of 12% PAGE) peptide control at pH 6.6 shows a band at the tail end of the gel. CN at pH 6.6 presents 4 bands (> 25 kDa) corresponding to all 4 types of CN (α s2-CN, β -CN, α s1-CN, and κ -CN). As micellar CN were used for this study, a very small amount of whey proteins (α -la and β -lg) was also observed. As observed on SEC-HPLC analysis, the decrease in CN solution's pH leads to a decrease in bands intensity (pH 5.6) and more drastically to the absence of protein in supernatant of pH < 4.6 solutions.

Contrarily to CN, and as noticed by visual aspect (Figure 3.2) and SEC-HPLC analysis (Figure 3.5), CN:peptide (1:1) solutions for the whole pH range do not present any difference in terms of migration profile. More interestingly, no bands corresponding to CNs were observed for the CN:peptide mixture at 1:1 ration. An increase in intensity of CN bands with the decrease of peptide concentration could be a strong indication of proteolytic behavior from this peptide.

These results seem to demonstrate that equal combination of CN and peptide (1:1) is not sensitive to a decrease of pH. Nevertheless and as previously mentioned concerning SEC-HPLC profiles, no trace of protein present in CN control is detected as bands from 10 to 15 kDa can be identified. Finally, lanes corresponding to both 5:1 and 10:1 ratio at pH > 4.6, show intermediate profiles with the presence of bands related to CN (> 25 kDa) and smaller bands (between 10 and 15 kDa) as observed for 1:1 solution. Though, for pH > 4.6, no bands corresponding to CN were observed and a lower intensity of bands from 10 to 15 kDa was noticed. Broadly speaking, the combination of peptide and CN (1:1) leads to a complete dissociation of the micelles and to a stable solution towards pH modification. The decrease in peptide concentration (5:1 and 10:1) results to a lower interaction between peptide and CN which generates intermediate profiles in both SEC-HPLC and SDS-PAGE analysis.

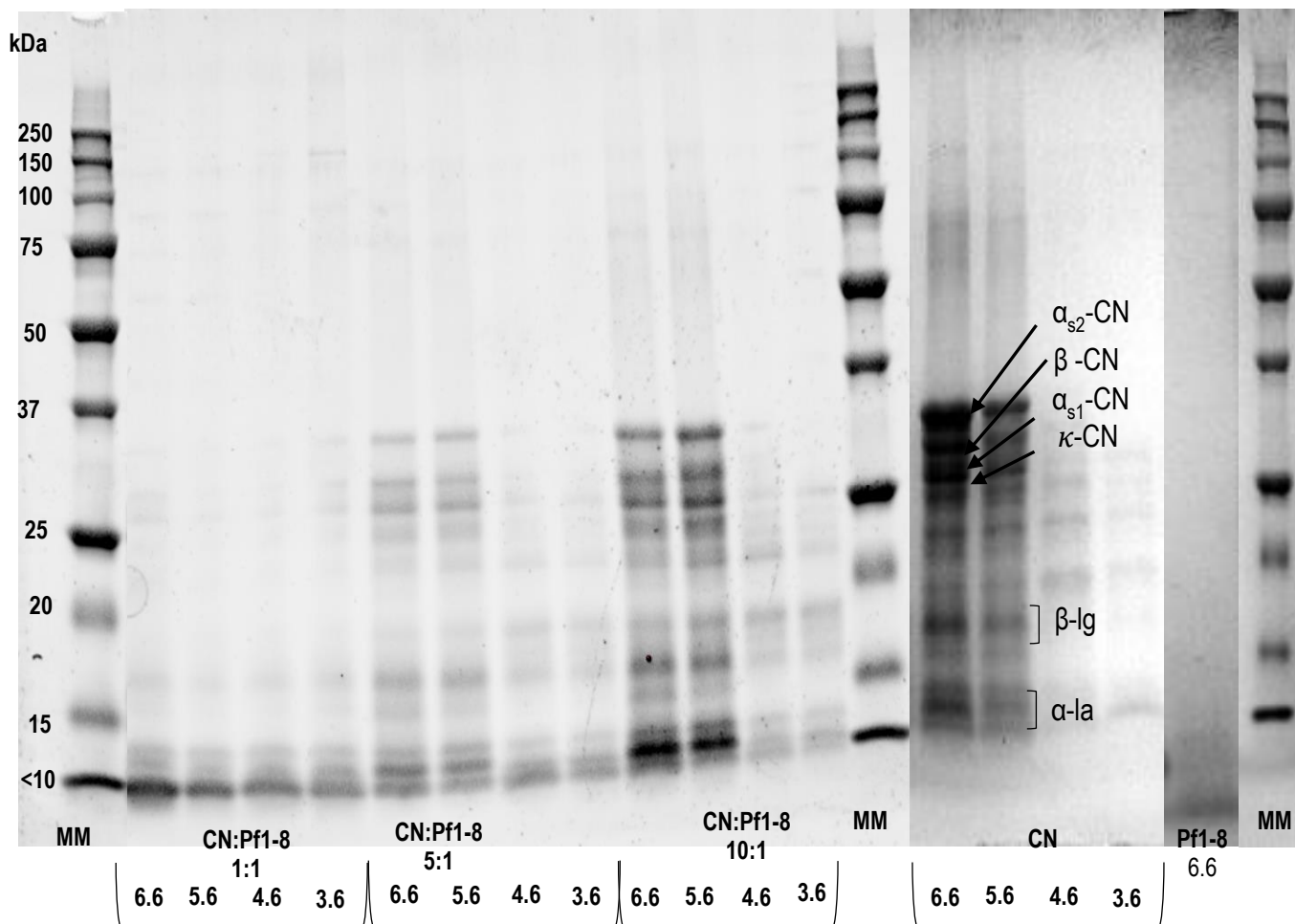


Figure 3.6. SDS page of the supernatants of the various CN: Pf1-8 and CN alone at pH 6.6 to 3.6 and Pf1-8 alone solution at pH 6.6 and molecular weight markers (MM).

6. Discussion

The present study was undertaken in order to study the impact of interaction between CN and Pf1-8 on the micellar stabilization. The visual observations indicated an interesting findings as the no conventional precipitation of CN alone occurred in the solution of CN: Pf1-8 mixture at 1:1 ratio even after pH 4.6 is surprising. Even though, it is too early to conclude about the type of peptide-CN interactions involved, it is possible that the peptide specifically interacts to the CNs through its hydrophobic domains inhibiting precipitation or has proteolytic activity. As the relative concentration of CN as compared to peptide increases (ratio 5:1 to 10:1), the CN turbidity increases at lower pH. This phenomenon suggests that as less number of peptides are available to bind with CN molecules, and the excess of CN are precipitated out at lower pH. The addition of Pf1-8 to the CN solution seems to

totally disrupt CN micelle and it can aggregated to form a big and complex structure with CN (Figure 3.3 and 3.4). Moreover, it appears to have a proteolytic effect on CN, as suggested by the molecular weight distribution of the CN: Pf1-8 mixture which is shifted towards the region of peptides alone (Figure 3.5) The CNs bands also disappear from the SDS-PAGE in these samples (Figure 3.6). Some studies have shown that the presence of peptides of β -lg could modify the functional properties of proteins. Indeed, in addition to its self-assembly capacity and high hydrophobicity, Pf1-8 has the ability to bind to the native β -lg and α -la. The interaction of this peptide with β -lg was found to modify the thermal denaturation profile (Barbeau et al. 1996) potentially by hydrophobic interactions with the hydrophobic core, but did not change the thermal properties for α -la) (Ratté 2013). The interaction of lactoferrin with CN showed a decrease in turbidity of solution by disintegrating the CN micelles (Anema et De Kruif 2011). The proteolytic behavior of this peptide is not yet demonstrated in the literature. However, this peptide has shown a 100% of a peptide sequence of *Escherichia coli* enterotoxin binding glycoprotein being able to bind to milk proteins including CN (Shida et al. 1994). More recently, an antifungal peptide from marine metagenome was found to possess a non-specific proteolytic activity of several proteins including CN (Pushpanathan et al. 2013). However, further studies such as LC-MS and enzymatic activity tests are needed to understand the mechanism between Pf1-8 and CN leading to its destabilization.

7. Conclusion

For the first time, no CN precipitation was observed from pH 6.6 to 2.6 for the 1: 1 ratio solution with a peptide. However, for 10: 1 and 5: 1, there was CN precipitation starting at pH 4.6. These low MW results were confirmed by the SEC-HPLC profiles for all tested pHs. It seems that Pf1-8 modifies the physicochemical properties of CN by increasing their solubility. More specifically, it appears from our result that the Pf1-8 could destabilize CN micelle and lead to their proteolysis as the peak and gel bands associated with CN disappeared almost completely in SEC-HPLC and SDS-PAGE profiles, respectively for the mixture with similar concentrations. Moreover, the electrophoresis analyses demonstrated the formation of smaller molecular weight (MW) inferior to 15 kDa fractions that might be the result of CN disintegration and proteolysis. However, further analysis of protein peptide complexes by HPLC could give a better insight.

8. Acknowledgements

The authors are thankful to Diane Gagnon, Mélanie Martineau and Pascal Lavoie for their technical support. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

CHAPITRE 4. DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet de maîtrise visait à étudier l'impact du peptide Pf1-8 issu de la β -lactoglobuline sur les propriétés structurales et physico-chimiques de la CN. Ces travaux ont montré que la précipitation des CN en présence du Pf1-8, spécifiquement à un ratio 1: 1, semblait ne pas se produire sur une large gamme de pH incluant le pH de 4,6. Également, lorsque la concentration relative de CN par rapport au peptide augmente (rapport de 5: 1 à 10: 1), le CN précipite à un pH plus bas que son pI isoélectrique conventionnel. Ce phénomène suggère un lien entre la concentration peptidique ou le nombre d'espèces peptidiques en solution et la déstabilisation de la micelle.

Plus spécifiquement, l'addition de Pf1-8 à la solution de CN semble perturber et déstabiliser totalement la structure micellaire. Il est surprenant de distinguer que même après déstructuration de la micelle en présence du Pf1-8, les espèces protéiques observées, à la fois sur gel SDS-PAGE et en SEC-HPLC, ne correspondaient nullement à des espèces caséiques seules dont le poids moléculaire varie de 19 à 25 kDa. Actuellement, les travaux effectués dans ce mémoire ne permettent pas d'expliquer précisément le mécanisme intervenant dans le phénomène observé. Cependant, il est possible d'émettre l'hypothèse que le peptide déstructure la micelle de CN qui se réorganise en agrégats de très hauts poids moléculaire et/ou très hydrophobes devenant ainsi plus difficilement détectable (reste piégé dans la pré-colonne, agrégats impossibles à pipeter, etc). De ce fait, il sera nécessaire de réaliser une étude plus poussée incluant des analyses de spectrométrie de masse, de structure de gel et de tests d'activité enzymatiques afin d'expliquer spécifiquement le(s) mécanisme(s) en jeu.

En lien avec le présent projet, nous pouvons confirmer l'hypothèse émise initialement qui stipulait que « *le peptide β -lg f1-8, généré après hydrolyse trypsique de la β -lactoglobuline, interagit avec les caséines et modifie leurs propriétés structurales et physico-chimiques* ». Les objectifs listés ont été réalisés avec succès excepté la caractérisation des espèces caséiques affectées (Obj. 2) du fait qu'aucune espèce caséique native n'a été observée après mise en solution du Pf1-8 et des CN.

En conclusion, les résultats présentés ont permis un avancement des connaissances scientifiques fondamentales sur la capacité d'interaction du Pf1-8 avec la CN et la capacité du peptide de modifier

les propriétés de solubilité de la micelle de CN. Toutefois, des connaissances supplémentaires seraient nécessaires afin de mieux comprendre les interactions réelles entre le Pf1-8 et la CN:

- Caractériser précisément les espèces protéiques/peptidiques en solution par spectrométrie de masse
- Déterminer une potentielle activité protéolytique du Pf1-8 en présence de la CN et étudier la cinétique de dégradation des CN micellaires.

Ces nouvelles observations totalement inattendues ouvrent la voie à des études plus fondamentales sur les propriétés du peptide Pf1-8 et sur son potentiel d'interaction avec les protéines. En effet, bien que dans cette étude, des structures de type colloïdales ont été étudiées (micelles de CN), il devient intéressant d'évaluer :

- L'effet du Pf1-8 sur la digestibilité de la CN en milieu *in vitro* et *in vivo* (TIM)
- Les modifications de propriétés fonctionnelles engendrées par le Pf1-8 sur diverses structures protéiques (globulaires (β -lg), complexes avec sous-unités (hémoglobine) ou non repliée et fortement chargée négativement (phosvitine)).

Bibliographie

- Adler-Nissen J (1976) Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J Agric Food Chem* 24:1090-1093. doi: 10.1021/jf60208a021
- Aggeli a, Nyrkova I a, Bell M, et al (2001) Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide beta -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11857-11862. doi: 10.1073/pnas.191250198
- Ambjerg Pedersen HC, Jørgensen BB (1991) Influence of pectin on the stability of casein solutions studied in dependence of varying pH and salt concentration. *Top Catal* 5:323-328. doi: 10.1016/S0268-005X(09)80044-1
- Anema SG, De Kruif CG (2011) Interaction of lactoferrin and lysozyme with casein micelles. *Biomacromolecules* 12:3970-3976. doi: 10.1021/bm200978k
- Barbeau J, Gauthier SF, Pouliot Y (1996) Thermal Stabilization of -Lactoglobulin by Whey Peptide Fractions.
- Brownlow S, Morais Cabral JH, Cooper R, et al (1997) Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution--still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5:481-495. doi: 10.1016/S0969-2126(97)00205-0
- Bylund G, Malmgren B, Holanowski A, et al (2015) *Dairy Processing Handbook*.
- Caroli AM, Chessa S, Erhardt GJ (2009) Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci* 92:5335-5352. doi: 10.3168/jds.2009-2461
- Cayot P, Lorient D (1998a) Protéines « Majeures » du Lactosérum. Dans: *Structure and technical properties of milk proteins. Technique et Documentation Lavoisier*, p 37-50
- Cayot P, Lorient D (1998b) Modifications chimiques (biochimiques) de l'environnement des protéins du lait. Dans: *Structure and technical properties of milk proteins. Technique et Documentation Lavoisier*, p 159-178
- Chay Pak Ting BP, Gauthier SF, Pouliot Y (2007) Fractionation of β -Lactoglobulin Tryptic Peptides using Spiral Wound Nanofiltration Membranes. *Sep Sci Technol* 42:2419-2433. doi: 10.1080/01496390701477188
- Chen SX, Swaisgood HE, Foegeding EA (1994) Gelation of β -Lactoglobulin Treated with Limited Proteolysis by Immobilized Trypsin. *J Agric Food Chem* 42:234-239. doi: 10.1021/jf00038a002
- Considine T, Patel H a., Anema SG, et al (2007) Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - A Review. *Innov Food Sci Emerg Technol* 8:1-23. doi:

10.1016/j.ifset.2006.08.003

- Corzo-Martínez M, Mohan M, Dunlap J, Harte F (2015) Effect of ultra-high pressure homogenization on the interaction between bovine casein micelles and ritonavir. *Pharm Res* 32:1055-1071. doi: 10.1007/s11095-014-1518-9
- Creusot N, Gruppen H (2007a) Enzyme-induced aggregation and gelation of proteins. *Biotechnol Adv* 25:597-601. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.007
- Creusot N, Gruppen H (2007b) Protein-peptide interactions in mixtures of whey peptides and whey proteins. *J Agric Food Chem* 55:2474-2481. doi: 10.1021/jf062608i
- Dalgleish D, Law AJR (1989) pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *J Dairy Res* 56:727-735. doi: 10.1017/S0022029900029290
- Dalgleish DG (1984) Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particles from milk using laser Doppler electrophoresis. *J Dairy Res* 51:425. doi: 10.1017/S0022029900023724
- Dalgleish DG, Spagnuolo PA, Douglas Goff H (2004) A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *Int Dairy J* 14:1025-1031. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.04.008
- Dar TA, Singh LR, Islam A, et al (2007) Guanidinium chloride and urea denaturations of β -Lactoglobulin A at pH 2.0 and 25 °C: The equilibrium intermediate contains non-native structures (helix, tryptophan and hydrophobic patches). *Biophys Chem* 127:140-148. doi: 10.1016/j.bpc.2007.01.006
- Davidovic M, Mattea C, Qvist J, Halle B (2009) Protein cold denaturation as seen from the solvent. *J Am Chem Soc* 131:1025-1036. doi: 10.1021/ja8056419
- de Kruijff CG, Holt C (2003) Casein micelle structure, functions and interactions. Dans: Fox PF, McSweeney PLH (éd) *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. Springer, Boston, MA, p 233–270
- De Kruijff CG, Huppertz T, Urban VS, Petukhov A V. (2012) Casein micelles and their internal structure. *Adv Colloid Interface Sci* 171-172:36-52. doi: 10.1016/j.cis.2012.01.002
- de Wit JN (2009) Thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. a review. *Trends Food Sci Technol* 20:27-34. doi: 10.1016/j.tifs.2008.09.012
- del Toro MAN, García-Carreño FL (2002) Evaluation of the Progress of Protein. *Curr Protoc Food Anal Chem* 1-14. doi: 10.1002/0471142913
- Dufour E, Herve G, Cedex Y, Haertle T (1995) Hydrolysis of β -Lactoglobulin by Thermolysin and Pepsin

- Under High Hydrostatic Pressure. *Biopolymers* 35:475–483. doi: 10.1002/bip.360350506
- Eck A, Gillis J-C (2006) *Le fromage*, 3th edn. Paris
- Fairman R, Åkerfeldt KS (2005) Peptides as novel smart materials. *Curr Opin Struct Biol* 15:453-463. doi: 10.1016/j.sbi.2005.07.005
- Farrell HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, et al (2004) Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *J Dairy Sci* 87:1641-1674. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6
- Fernández A, Riera F (2013) β -Lactoglobulin tryptic digestion: A model approach for peptide release. *Biochem Eng J* 70:88-96. doi: 10.1016/j.bej.2012.10.001
- Fernández A, Zhu Y, Fitzgerald RJ, Riera F a. (2014) Membrane fractionation of a β -lactoglobulin tryptic digest: Effect of the membrane characteristics. *J Chem Technol Biotechnol* 89:508-515. doi: 10.1002/jctb.4144
- Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA (2015a) *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham
- Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA (2015b) *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham
- Gauthier SF, Pouliot Y (2003) Functional and Biological Properties of Peptides Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. *J Dairy Sci* 86:E78-E87. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)74041-7
- Grzyb J, Latowski D, Strzałka K (2006) Lipocalins - a family portrait. *J Plant Physiol* 163:895-915. doi: 10.1016/j.jplph.2005.12.007
- Guy M (2011) Caractérisation des interactions moléculaires menant à l'auto- assemblage du peptide β -lg fl-8. Université Laval
- Guy MM, Tremblay M, Voyer N, et al (2011) Formation and stability of nanofibers from a milk-derived peptide. *J Agric Food Chem* 59:720-726. doi: 10.1021/jf103312t
- Guy MM, Voyer N (2012) Structure and hydrogel formation studies on homologs of a lactoglobulin-derived peptide. *Biophys Chem* 163-164:1-10. doi: 10.1016/j.bpc.2011.12.005
- Haines-Butterick L, Rajagopal K, Branco M, et al (2007) Controlling hydrogelation kinetics by peptide design for three-dimensional encapsulation and injectable delivery of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7791-7796. doi: 10.1073/pnas.0701980104
- Hattori M, Watabe A, Takahashi K (1995) β -Lactoglobulin Protects β -Ionone Related Compounds from Degradation by Heating, Oxidation, and Irradiation. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:2295-2297. doi: 10.1271/bbb.59.2295

- Holt C (1992) Structure and stability of bovine casein micelles. Dans: *Advances in protein chemistry*, 43^e edn. p 63-151
- Holt C (2004) An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. *Eur Biophys J* 33:421-434. doi: 10.1007/s00249-003-0377-9
- Holt C, Timmins PA, Errington N, Leaver J (1998) A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by beta-casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron-scattering measurements. *Eur J Biochem* 252:73-78. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2520073.x
- Horne DS (2008) Casein Micelle Structure and Stability. Dans: *Milk Proteins*. p 133-162
- Horne DS (2016) Ethanol Stability and Milk Composition. Dans: McSweeney PLH, O'Mahony JA (éd) *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*. Springer New York, New York, NY, p 225-246
- Horne DS (1984) Steric effects in the coagulation of casein micelles by ethanol. *Biopolymers* 23:989-993. doi: 10.1002/bip.360230602
- Horne DS (2006) Casein micelle structure: Models and muddles. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 11:148-153. doi: 10.1016/j.cocis.2005.11.004
- Horne DS (2002) Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 7:456-461. doi: 10.1016/S1359-0294(02)00082-1
- Horne DS (1998) Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int Dairy J* 8:171-177. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00040-5
- Horne DS, Davidson CM (1986) The effect of environmental conditions on the steric stabilization of casein micelles. *Colloid Polym Sci* 264:727-734. doi: 10.1007/BF01469535
- Huppertz T, Fox PF (2006) Effect of NaCl on some physico-chemical properties of concentrated bovine milk. *Int Dairy J* 16:1142-1148. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.09.011
- Jeyarajah S, Allen JC (1994) Calcium Binding and Salt-Induced Structural Changes of Native and Preheated & Lactoglobulin. *J Agricultural Food Chem* 42:80-85.
- Kontopidis G, Holt C, Sawyer L (2004) Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J Dairy Sci* 87:785-796. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1
- Korhonen H, Pihlanto A (2006) Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J* 16:945-960. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012

- Kosters HA, Wierenga PA, Gruppen H (2010) SELDI-TOF-MS as a rapid tool to study food related protein-peptide interactions. *Food Hydrocoll* 24:667-673. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.03.011
- Lamm MS, Rajagopal K, Schneider JP, Pochan DJ (2005) Laminated morphology of nontwisting β -sheet fibrils constructed via peptide self-assembly. *J Am Chem Soc* 127:16692-16700. doi: 10.1021/ja054721f
- Marchin S, Putaux J-L, Pignon F, Léonil J (2007) Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultrasmall-angle x-ray scattering. *J Chem Phys* 126:45101. doi: 10.1063/1.2409933
- Marciniak A, Suwal S, Britten M, et al (2018) The use of high hydrostatic pressure to modulate milk protein interactions for the production of an alpha-lactalbumin enriched-fraction. *Green Chem* 20:515-524. doi: 10.1039/c7gc03428h
- McKenzie HA, Shaw DC (1972) Alternate Positions for the Sulphydryl Group in β -Lactoglobulin: the Significance for Sulphydryl Location in Other Proteins. *Nat New Biol* 238:147-149. doi: 10.1038/newbio238147a0
- McMahon DJ, Du H, McManus WR, Larsen KM (2009) Microstructural changes in casein supramolecules during acidification of skim milk. *J Dairy Sci* 92:5854-5867. doi: 10.3168/jds.2009-2324
- McMahon DJ, Oommen BS (2008) Supramolecular Structure of the Casein Micelle. *J Dairy Sci* 91:1709-1721. doi: 10.3168/jds.2007-0819
- Mcsweeney PLH, Fox PF (2013) *Advanced Dairy Chemistry Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*.
- Mehra R, O'Kennedy BT (2008) Separation of β -Lactoglobulin from Whey: Its Physico-Chemical Properties and potential Uses. Dans: Onwulata CI, Huth PJ (éd) *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, 1^{re} edn. Wiley-Blackwell, Iowa, p 39-62
- Monaco HL, Zanotti G, Spadon P, et al (1987) Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* 197:695-706. doi: 10.1016/0022-2836(87)90476-1
- Muhammad G, Croguennec T, Julien J, et al (2009) Copper modulates the heat-induced sulfhydryl/disulfide interchange reactions of β -Lactoglobulin. *Food Chem* 116:884-891. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.043
- Mullally MM, Meisel H, Fitzgerald RJ (1997) Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett*

402:99-101. doi: 10.1016/S0014-5793(96)01503-7

- Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, et al (2001) Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 281:11-17. doi: 10.1006/bbrc.2001.4298
- Noiseux I, Gauthier SF, Turgeon SL (2002) Interactions between bovine β -lactoglobulin and peptides under different physicochemical conditions. *J Agric Food Chem* 50:1587-1592. doi: 10.1021/jf010887y
- Olsen J V., Ong S-E, Mann M (2004) Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Mol Cell Proteomics* 3:608-614. doi: 10.1074/mcp.T400003-MCP200
- Ortega-Requena S, Rebouillat S (2015) Retracted Article: Bigger data open innovation: potential applications of value-added products from milk and sustainable valorization of by-products from the dairy industry. *Green Chem* 17:5100-5113. doi: 10.1039/C5GC01428J
- Otte J, Lomholt SB, Halkier T, Qvist KB (2000) Identification of peptides in aggregates formed during hydrolysis of β -lactoglobulin B with a Glu and Asp specific microbial protease. *J Agric Food Chem* 48:2443-2447. doi: 10.1021/jf990947o
- Otte J, Zakora M, Qvist KB, et al (1997) Hydrolysis of bovine β -Lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. *Int Dairy J* 7:835-848. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00003-X
- Pan K, Luo Y, Gan Y, et al (2014) pH-driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity. *Soft Matter* 10:6820. doi: 10.1039/C4SM00239C
- Papiz MZ, Sawyer L, Eliopoulos EE., et al (1986) The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* 324:383-385.
- Parker A, Boulenguer P, Kravtchenko TP (1993) Effect of the Addition of High Methoxy Pectin on the Rheology and Colloidal Stability of Acid Milk Drinks. Dans: Nishinari K, Doi E (éd) *Food Hydrocolloids: Structures, Properties, and Functions*. Springer US, Boston, MA, p 307-312
- Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P (2001) Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1526:131-140. doi: 10.1016/S0304-4165(01)00116-7
- Pessen H, Purcell JM, Farrell HM (1985) Proton relaxation fates of water in dilute-solutions of β -lactoglobulin - Determination of cross relaxation and correlation with structural-changes by the use of 2 genetic-variants of a self-associating globular protein. *Biochem Biophys Acta* 828:1-12.

- Piez KA, Davie EW, Folk JE, Gladner JA (1961) β -Lactoglobulins A and B. I. Chromatographic separation and amino acid composition. *J Biol Chem* 236:2912-2916.
- Pihlanto-Leppälä A, Rokka T, Korhonen H (1998) Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int dairy J* 8:325-331. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00048-X
- Post AE, Arnold B, Weiss J, Hinrichs J (2012) Effect of temperature and pH on the solubility of caseins: Environmental influences on the dissociation of α S- and β -casein. *J Dairy Sci* 95:1603-1616. doi: 10.3168/jds.2011-4641
- Pouliot Y, Guy MM, Tremblay M, et al (2009) Isolation and characterization of an aggregating peptide from a tryptic hydrolysate of whey proteins. *J Agric Food Chem* 57:3760-3764. doi: 10.1021/jf803539f
- Pushpanathan M, Rajendhran J, Gunasekaran P (2013) Proteolytic activity of the MMGP1 antifungal peptide derived from marine metagenome. *Int J Pept Res Ther* 19:331-336. doi: 10.1007/s10989-013-9351-2
- Qin BY, Bewley MC, Creamer LK, et al (1998) Structural basis of the tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry* 37:14014-14023. doi: 10.1021/bi981016t
- Ratté G (2013) Interaction entre un peptide de β -lactoglobuline bovine (β -lg f1-8) et les protéines du lactosérum.
- Sawyer L (2013) β -Lactoglobulin. Dans: McSweeney, P. L. H.; Fox PF (éd) *Advanced Dairy Chemistry*, 4^e edn. Springer, New York, p 211-259
- Sawyer L (2003) β -Lactoglobulin. Dans: Fox PF, McSweeney PLH (éd) *Advanced Dairy Chemistry*, A. Kluwer Academic/Plenum, New York, p 319-386
- Sawyer L, Brownlow S, Polikarpov I, Wu SY (1998) β -lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *Int Dairy J* 8:65-72. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00021-1
- Sawyer L, Kontopidis G (2000) The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 1482:136-148. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00160-6
- Schmidt DG, Both P, Van Markwijk BW, Buchheim W (1974) The determination of size and molecular weight of casein micelles by means of light-scattering and electron microscopy. *BBA - Protein Struct* 365:72-79. doi: 10.1016/0005-2795(74)90251-7
- Shida K, Takamizawa K, Nagaoka M, et al (1994) Enterotoxin-binding glycoproteins in a proteose-peptone fraction of heated bovine milk. *J Dairy Sci* 77:930-9. doi: 10.3168/JDS.S0022-

0302(94)77028-4

- Slattery CW (1977) Model calculations of casein micelle size distribution. *Biophys Chem* 6:59-64.
- Slattery CW, Evard R (1973) A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *BBA - Protein Struct* 317:529-538. doi: 10.1016/0005-2795(73)90246-8
- Stapelfeldt H, Petersen PH, Kristiansen KR, et al (1996) Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis of beta-lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. *J Dairy Res* 63:111-118.
- Tanford C, Bunville LG, Nozaki Y (1959) The reversible transformation of B-lactoglobulin. *J Am Chem Soc* 81:4032-4036.
- Taulier N, Chalikian T V (2001) Characterization of pH-induced transitions of beta-lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *J Mol Biol* 314:873-889. doi: 10.1006/jmbi.2001.5188
- Tromp RH, De Kruif CG, Van Eijk M, Rolin C (2004) On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin. *Food Hydrocoll* 18:565-572. doi: 10.1016/j.foodhyd.2003.09.005
- Turgeon SL, Gauthier SF, Molle D, Leonii J (1992) Interfacial Properties of Tryptic Peptides of β -Lactoglobulin. *J Agric Food Chem* 40:669-675. doi: 10.1021/jf00016a030
- Ulijn R V, Smith AM (2008) Designing peptide based nanomaterials. *Chem Soc Rev* 37:664-675. doi: 10.1039/b609047h
- Van Willige RWG, Fitzgerald RJ (1995) Tryptic and chymotryptic hydrolysis of β -lactoglobulin A, B and AB at ambient and high pressure. *Milchwissenschaft* 50:183-186.
- Vasbinder AJ, Rollema HS, de Kruif CG (2003) Impaired Rennetability of Heated Milk; Study of Enzymatic Hydrolysis and Gelation Kinetics. *J Dairy Sci* 86:1548-1555. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73740-0
- Vermeirssen V, Camp J Van, Verstraete W (2004) Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* 92:357. doi: 10.1079/BJN20041189
- Wang Q, Allen JC, Swaisgood HE (1998) Protein concentration dependence of palmitate binding to β -lactoglobulin. *J Dairy Sci* 81:76-81. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75553-5
- Waugh DF (1958) The interactions of α - β - and κ -caseins in micelle formation. *Discuss Faraday Soc* 25:186-192. doi: 10.1039/DF9582500186
- Yang J, Yang J, Powers JR, et al (2003) Ligand and flavor binding functional properties of beta-lactoglobulin in the molten globule state induced by high pressure. *J Food Sci* 68:444-452.

Yang M-C, Guan H-H, Liu M-Y, et al (2008) Crystal structure of a secondary vitamin D3 binding site of milk beta-lactoglobulin. *Proteins* 71:1197-210. doi: 10.1002/prot.21811