

MAUDE GIRARD

**ÉTUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES
INTERACTIONS ENTRE LA
β-LACTOGLOBULINE ET LA PECTINE
EN SYSTÈME DILUÉ**

Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Département de sciences des aliments et nutrition
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

SEPTEMBRE 2003

© Maude Girard, 2003

Résumé court

La caractérisation des interactions protéines/polysaccharides a été réalisée à l'aide d'un système modèle β -lactoglobuline (β -lg)/pectine. Les pH de formation des complexes solubles entre la β -lg et la pectine faiblement ou hautement méthylée (pectine LM ou HM) mesurés par titrage potentiométrique sont de 6,1 et 5,5, respectivement. L'importance des interactions électrostatiques et la présence de liens hydrogène ont été démontrées par la dissociation des complexes en présence d'agents déstabilisants. La constante d'association, la stoechiométrie, la taille du site de liaison et la coopérativité des complexes ont été déterminés sous différentes conditions. Les paramètres d'interaction des peptides β -lg 132-148, 76-83, 41-60 et 1-14 suggèrent l'implication de ces zones peptidiques dans les complexes β -lg/pectine. L'initiation de l'interaction entre la β -lg et la pectine se traduit par la formation de complexes solubles d'origine enthalpique. La neutralisation des complexes induit leur agrégation et leur insolubilisation. Des facteurs d'origines entropique et enthalpique sont favorables à cette agrégation. La séparation de phases observée lors de l'agrégation des complexes s'effectue selon un mécanisme de nucléation et croissance.

Maude Girard

Sylvie Turgeon

Professeure

Résumé long

La caractérisation des interactions entre les protéines et les polysaccharides a été réalisée à l'aide d'un système modèle β -lactoglobuline (β -lg)/pectine. Les pH de formation des complexes solubles (pH_c) entre la β -lg et la pectine faiblement ou hautement méthylée (pectine LM ou HM) mesurés par titrage potentiométrique sont de 6,1 et 5,5, respectivement. L'effet déstabilisant du chlorure de sodium, de l'urée et d'une augmentation de la température ont démontré que les interactions maintenant les complexes β -lg/pectine LM ou HM sont majoritairement de nature électrostatique et en partie dues à des liens hydrogène. Les paramètres d'interaction des complexes β -lg/pectine LM ou HM ont été déterminés par l'analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE). À pH 4, environ 23 molécules de β -lg sont liées de manière coopérative sur la pectine LM. En se liant à la pectine, une molécule de β -lg couvre un espace moyen de 12 résidus D-galA. La constante d'association dans ces conditions est de 1431 M^{-1} . Les peptides β -lg 132-148, 76-83, 41-60 et 1-14 ont démontré une interaction attractive avec la pectine. Le titrage calorimétrique isothermique (ITC) a été utilisé pour caractériser les paramètres thermodynamiques des interactions β -lg/pectine. La complexation entre la β -lg et la pectine s'effectue en deux étapes correspondant à la formation de complexes intrapolymères solubles dirigée par l'enthalpie suivie par une agrégation en complexes interpolymères insolubles résultant de facteurs enthalpique et entropique favorables. La diffusion statique de la lumière aux petits angles a permis d'identifier la nucléation et croissance comme étant le mécanisme impliqué lors de la séparation de phase induite par la formation des complexes. Les deux étapes de la complexation ainsi qu'une organisation locale des complexes β -lg/pectine lors de l'acidification ont aussi été démontrées. La microscopie en contraste de phases a permis d'observer les structures détectés par diffusion de la lumière. Les connaissances acquises sur les interactions β -lg/pectine seront applicables à des projets de recherche dans le domaine des ingrédients alimentaires.

Maude Girard

Sylvie Turgeon

Professeure

Abstract

The aim of this study was to characterize protein/polysaccharide interactions using the β -lactoglobulin (β -lg)/pectin as a model system. The pH values leading to the formation of soluble complexes (pH_c) between β -lg and low or high-methoxyl-pectin (LM- or HM-pectin) measured with titration were 6.1 and 5.5, respectively. The destabilizing effect of sodium chloride, urea and temperature has demonstrated that interactions in the systems are mainly caused by electrostatic forces and, to a lesser extent, hydrogen bonding. Binding parameters of β -lg/pectin complexes were determined using frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE). At pH 4, approximately 23 β -lg molecules are cooperatively complexed on LM-pectin, where each β -lg molecule covers an average of 12 D-galA residues. The calculated binding constant is 1431 M^{-1} . The peptides β -lg 132-148, 76-83, 41-60, and 1-14 would be involved in the interaction with the pectin. Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to characterize the thermodynamic parameters of β -lg/LM- or HM-pectin complexes. The binding isotherms revealed the formation of soluble intrapolymer complexes further followed by their aggregation in insoluble interpolymer complexes. The soluble complexes were enthalpically driven, whereas enthalpic and entropic factors were involved in the insoluble complexes formation. Static light scattering was used to monitor the phase separation of β -lg/LM and HM-pectin mixtures as they were acidified with glucono- δ -lactone (GDL). This technique was used to confirm the two-step mechanism observed with ITC. The phase separation resulting from complexation was achieved through a nucleation and growth mechanism. The increase of complexation in solution with acidification led to a local ordering of systems. Complex formation through acidification was confirmed using phase contrast microscopy. A better understanding of β -lg/pectin interactions was required to achieve research projects using complexes as food ingredients.

Maude Girard

Sylvie Turgeon

Professeure

Avant-Propos

La réalisation de ce projet de doctorat a été parsemée de défis personnels et professionnels. La rédaction de cette thèse marque la fin d'une bien belle époque. Bien que le « bonheur soit en nous », plusieurs personnes ont marqué de façon positive cette période de ma vie.

Un premier merci à ma directrice de thèse Sylvie Turgeon qui par ses encouragements, son positivisme, sa franchise et son calme inébranlable a su m'accompagner lors de ces années au doctorat. Merci à ma co-directrice qui, avec son « œil de lynx », a permis d'ajouter une grande qualité aux travaux présentés. Merci à Christian Sanchez pour sa contribution à l'article en diffusion statique de la lumière.

Merci à tous les gens du centre STELA qui ont collaboré aux travaux en laboratoire: Anne-Françoise Allain, Sandra Laneuville et Alain Gaudreau. Certaines personnes externes ont aussi apporté une aide précieuse: Jacques Lapointe et Louis-Patrick Gagnon du CREFSIP et Rémy Coulombe du CRDV. Merci aux stagiaires qui ont égayé mes étés: Michèle Tessier, Caroline Gagné, Frédéric Bellavance et Annick Champoux. Un merci particulier aux étudiants du Centre STELA qui ont su rendre l'ambiance de travail plus qu'agréable. Je suis déjà nostalgique des dîners dans la fameuse « tite salle ».

Merci également aux membres de ma famille et de ma belle-famille qui ont contribué par leur présence et leur gentillesse à mon bonheur. Un merci tout spécial à mon conjoint Yann Doleyres dont l'amour et l'appui ont joué un rôle incontestable dans l'accomplissement de ce projet.

Merci à la Fondation de l'Université Laval qui m'a permis de mieux vivre pendant ces années. Merci au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada sans qui, la présentation de cette thèse n'aura pas été possible.

Cette thèse a été rédigée sous la forme de quatre articles scientifiques. Le premier chapitre intitulé « Introduction générale » est une revue de littérature portant sur les biopolymères à l'étude, la théorie des interactions moléculaires, les interactions

protéine/polysaccharide et la méthodologie utilisée dans le projet. La présentation de l'hypothèse de travail, du but et des objectifs spécifiques conclut ce chapitre.

Le deuxième chapitre est intitulé « Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- or high-methoxyl pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration » et est publié dans le journal « *Food Hydrocolloids* » **2002** (16) 585-591. Il porte sur la détermination des conditions permettant la formation de complexes β -lactoglobuline/pectine, ainsi que sur l'identification de la nature des interactions impliquées dans ces complexes. J'ai contribué à ce travail en accomplissant la totalité des manipulations en laboratoire au centre STELA et en effectuant la rédaction de l'article. Sylvie Turgeon et Sylvie Gauthier ont apporté leur soutien scientifique lors des expérimentations en laboratoire et lors de la rédaction de l'article.

Le troisième chapitre intitulé « Quantification of the interactions between β -lactoglobulin and pectin through capillary electrophoresis analysis » est sous presse dans la revue « *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ». Cet article porte sur la quantification des interactions entre la β -lactoglobuline et la pectine (constante d'association, taille du site de liaison, stœchiométrie des complexes) en utilisant une technique originale en électrophorèse capillaire. Les sites potentiellement réactifs de la β -lactoglobuline ont été identifiés par l'ultrafiltration de mélanges pectine/peptides β -lactoglobuline. J'ai contribué à ce travail en réalisant l'intégralité des manipulations en laboratoire au Centre STELA et en effectuant la rédaction de l'article. Sylvie Turgeon et Sylvie Gauthier ont apporté leur soutien scientifique lors des expérimentations en laboratoire et lors de la rédaction de l'article.

Le quatrième chapitre intitulé « Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin/pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry » est publié dans la revue « *Journal of Agricultural and Food Chemistry* » **2003** (51) 4450-4455. Certains paramètres thermodynamiques tels que l'enthalpie, l'entropie, l'énergie libre de Gibbs, la constante d'association et la stœchiométrie de complexes β -lactoglobuline/pectine ont pu être déterminés par une technique de titrage isothermique calorimétrique. L'utilisation de cette technique a permis d'appuyer les paramètres quantitatifs déterminés par électrophorèse

capillaire (chapitre 3). J'ai contribué à ce travail en accomplissant la totalité des expériences ainsi qu'en rédigeant l'article. Les manipulations en laboratoire ont été réalisées grâce à la collaboration du professeur Jacques Lapointe, membre du groupe de recherche CREFSIP de l'université Laval. Sylvie Turgeon et Sylvie Gauthier ont apporté leur soutien scientifique lors des expérimentations en laboratoire et lors de la rédaction de l'article.

Le cinquième chapitre intitulé « Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: A kinetic study by small angle static light scattering » est soumis au journal « Langmuir ». Cette étude a permis de suivre la cinétique de séparation de phases lors de la formation des complexes β -lactoglobuline/pectine. J'ai effectué les manipulations en laboratoire au Centre de Recherche sur la Défense du Canada situé à Valcartier. Christian Sanchez et Sandra Laneuville ont contribué au travail par leurs conseils scientifiques lors de la préparation des manipulations et de l'interprétation des résultats. Sylvie Turgeon et Sylvie Gauthier ont apporté leur soutien scientifique lors de la rédaction de l'article.

Un sixième chapitre intitulé « Conclusion générale » conclut le travail par une discussion générale de l'ensemble des résultats présentés tout au long du document et par la présentation des perspectives de recherche. Enfin, l'ensemble des références citées dans le texte ont été décrites à la fin du document, dans la section bibliographie.

à celles qui n'ont pas accès à l'éducation

Table des matières

RÉSUMÉ COURT	II
RÉSUMÉ LONG	III
ABSTRACT	IV
AVANT-PROPOS	V
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES FIGURES	XIV
CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 INTRODUCTION	2
1.2 BIOPOLYMÈRES À L'ÉTUDE	4
1.2.1 La β -lactoglobuline	4
1.2.1.1 Origine et structure	4
1.2.1.2 Influence du milieu sur la structure	6
1.2.2 La Pectine	7
1.2.2.1 Origine et structure	7
1.2.2.2 Influence du milieu sur la structure	9
1.3 LES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES	11
1.3.1 Liens covalents	11
1.3.2 Interactions électrostatiques.....	12
1.3.3 Forces de van der Waals	13
1.3.4 Forces de dispersion de London	13
1.3.5 Répulsions stériques	14
1.3.6 Interactions hydrophobes	14
1.4 LES SOLUTIONS DE POLYMÈRES	15
1.4.1 Principes de thermodynamique	15
1.4.2 Loi de Raoult	16
1.4.3 Les théories matricielles	17
1.4.4 La théorie de Flory-Huggins	18
1.4.4.1 Enthalpie de mélange nulle	20
1.4.4.2 Enthalpie de mélange non nulle	20
1.5 INCOMPATIBILITÉ ET COMPATIBILITÉ THERMODYNAMIQUE	23
1.5.1 Cas particulier des interactions protéine/polysaccharide	23

1.5.2 La formation de complexes	26
1.5.3 Facteurs influençant la nature des complexes	27
1.5.3.1 Charge des macromolécules	27
1.5.3.2 Le pH	27
1.5.3.3 Nature du polysaccharide	28
1.5.3.4 Poids moléculaire	28
1.5.3.5 Influence du milieu sur la structure	28
1.5.3.6 Méthode de fabrication	29
1.5.4 Cinétique de la séparation de phases	29
1.5.5 Le système β -lactoglobuline/pectine	30
1.6 TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION	32
1.6.1 Électrophorèse capillaire	32
1.6.1.1 Principe de base	32
1.6.1.2 Analyse frontale continue	35
1.6.2 Titration calorimétrique isothermique	37
1.6.3 Diffusion statique de la lumière aux petits angles	41
1.7 HYPOTHÈSE, BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	45
1.7.1 Hypothèse	45
1.7.2 But	45
1.7.3 Objectifs spécifiques	45

CHAPITRE 2: INTERBIOPOLYMER COMPLEXING BETWEEN B-LACTOGLOBULIN AND LOW- OR HIGH-METHOXYL PECTIN MEASURED BY POTENTIOMETRIC TITRATION AND ULTRAFILTRATION.....47

2.1 RÉSUMÉ	48
2.2 ABSTRACT	49
2.3 INTRODUCTION	50
2.4 MATERIALS AND METHODS	52
2.4.1 Materials	52
2.4.2 Potentiometric Titrations	52
2.4.3 Quantification of the complexed β -lg	53
2.4.4 Statistical Analysis	54
2.5 RESULTS AND DISCUSSION	55
2.5.1 Potentiometric Titrations	55
2.5.2 Ultrafiltration	56
2.6 CONCLUSION	59

CHAPITRE 3: QUANTIFICATION OF THE INTERACTIONS BETWEEN B-LACTOGLOBULIN AND PECTIN THROUGH CAPILLARY ELECTROPHORESIS ANALYSIS.....	66
3.1 RÉSUMÉ	67
3.2 ABSTRACT	68
3.3 INTRODUCTION	69
3.4 MATERIALS AND METHODS	71
3.4.1 Materials.....	71
3.4.2 Preparation of solutions.....	71
3.4.3 Frontal analysis continuous capillary electrophoresis	71
3.4.4 Ultrafiltration	72
3.4.5 Calculation of the binding parameters	73
3.5 RESULTS	75
3.6 DISCUSSION	78
3.7 CONCLUSION.....	82
CHAPITRE 4: THERMODYNAMIC PARAMETERS OF β-LACTOGLOBULIN/PECTIN COMPLEXES ASSESSED BY ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY.....	90
4.1 RÉSUMÉ	91
4.2 ABSTRACT	92
4.3 INTRODUCTION	93
4.4 MATERIALS AND METHODS	95
4.4.1 Materials.....	95
4.4.2 Preparation of solutions.....	95
4.4.3 Isothermal titration calorimetry	96
4.4.4 Overlapping binding site model	96
4.5 RESULTS	99
4.6 DISCUSSION	104
4.7 CONCLUSION.....	107

CHAPITRE 5: ASSOCIATIVE PHASE SEPARATION OF B-LACTOGLOBULIN/PECTIN SOLUTIONS: A KINETIC STUDY BY SMALL ANGLE STATIC LIGHT SCATTERING	112
5.1 RÉSUMÉ	113
5.2 ABSTRACT	114
5.3 INTRODUCTION	115
5.4 MATERIALS AND METHODS	118
5.4.1 Materials.....	118
5.4.2 Preparation of solutions.....	118
5.4.3 Optical microscopy	118
5.4.4 Small angle static light scattering	119
5.5 RESULTS	120
5.5.1 Optical microscopy	120
5.5.2 Small angle static light scattering	120
5.6 DISCUSSION	123
5.7 CONCLUSION.....	127
CHAPITRE 6: CONCLUSION GÉNÉRALE.....	134
BIBLIOGRAPHIE	139

Liste des tableaux

Table 2.1 Relative charge on β -lg/pectin complex at different ratios β -lg/pectin. ...	61
Table 3.1 Binding parameters of β -lg/LM- or HM-pectin complexes calculated with the overlapping binding site model.....	83
Table 3.2 Binding parameters of the peptides β -lg 1-14, 41-60, 76-83, or 132-148/LM-pectin complexes calculated with the overlapping binding site model.	84
Table 4.1 Thermodynamic parameters of β -lg/LM- or HM-pectin complexes determined with the Microcal ORIGIN software.	108

Liste des figures

Figure 1.1 Structure primaire de la β -lactoglobuline A.	4
Figure 1.2 Structure tridimensionnelle d'un monomère de la β -lactoglobuline A.	5
Figure 1.3 Chaîne principale d'une pectine.....	8
Figure 1.4 Structure schématique de la pectine.....	8
Figure 1.5 Théorie matricielle pour une solution réelle	18
Figure 1.6 Modèle de Flory-Huggins.....	19
Figure 1.7 Schématisation de la décomposition spinodale et de la nucléation et croissance.....	30
Figure 1.8 Principe de l'électrophorèse.....	32
Figure 1.9 Ensemble des composantes d'un appareil d'électrophorèse capillaire .	33
Figure 1.10 Électrophérogramme d'un mélange ternaire analysé par FACCE.	35
Figure 1.11 Modèle des sites de liaison superposés	36
Figure 1.12 Schéma d'un appareil ITC	38
Figure 1.13 Exemple d'un thermogramme et d'un isotherm d'interaction.....	39
Figure 1.14 Isothermes d'interactions en fonction de la valeur c	40
Figure 1.15 Angle de diffusion de la lumière en fonction de la taille des particules	41
Figure 1.16 Schéma d'un appareil de diffusion statique de la lumière aux petits angles.	42
Figure 2.1 Titration curves of β -lg/pectin mixtures at different ratios.....	62
Figure 2.2 Titration curves of β -lg alone and β -lg/pectin mixtures at 4:1 ratio in deionized water, with NaCl or urea.	63
Figure 2.3 β -lg complexed with LM- and HM-pectin, at 4:1 ratio and at different pH in deionized water, NaCl or urea.....	64
Figure 2.4 β -lg complexed with LM- and HM-pectin, at 4:1 ratio, in deionized water at 4°C and 40°C.....	65

Figure 3.1 Localization of the selected peptides on the β -lactoglobulin molecule..	85
Figure 3.2 Typical electropherogram obtained for the β -Ig/LM- or HM-pectin complexes.....	86
Figure 3.3 Binding isotherms of β -Ig/LM-pectin mixtures in 5 mM phosphate buffer at pH 4, 5, and 6, and in 50 mM phosphate buffer at pH 5.	87
Figure 3.4 Binding isotherms of β -Ig/HM-pectin mixtures in 5 mM phosphate buffer at pH 4 and 5, and in 50 mM phosphate buffer at pH 5.	88
Figure 3.5 Binding isotherms of peptides β -Ig 1-14, 41-60, 76-83 and 132-148/LM-pectin complexes at pH 4 in 5 mM sodium phosphate buffer.....	89
Figure 4.1 Thermogram and binding isotherm of the β -Ig complexing with LM-pectin at pH 4 in 5 mM sodium phosphate buffer.....	109
Figure 4.2 Thermogram and binding isotherm of the β -Ig complexing with HM-pectin at pH 4 in 5 mM sodium phosphate buffer.....	110
Figure 4.3 Scatchard plots of the β -Ig/LM-pectin and HM-pectin mixtures at pH 4 in 5 mM sodium phosphate buffer.	111
Figure 5.1 Phase contrast micrographs from β -Ig/LM- and β -Ig/HM-pectin solutions at 5:1 and 2:1 ratios	128
Figure 5.2 Evolution of turbidity with time calculated for β -Ig/LM- and HM-pectin solutions at 5:1 and 2:1 ratios.	129
Figure 5.3 Number and volume mean diameters of β -Ig/LM- and HM-pectin solutions at 5:1 and 2:1 ratios.	130
Figure 5.4 Light scattering intensity as a function of the wave vector for the β -Ig/LM-pectin solution at 5:1 and 2:1 ratios.	131
Figure 5.5 Light scattering intensity as a function of the wave vector for the β -Ig/HM-pectin solution at 5:1 and 2:1 ratios.....	132
Figure 5.6 Time evolution of fractal dimensions of β -Ig/LM- and HM-pectin solutions at ratios 5:1 and 2:1.	133

CHAPITRE 1: Introduction générale

1.1 INTRODUCTION

Les propriétés fonctionnelles des protéines et des polysaccharides apportent une diversité de qualités organoleptiques aux aliments. Le comportement de ces macromolécules est grandement influencé par la présence d'autres constituants. Ceci s'illustre, entre autres, par les interactions entre les protéines et les polysaccharides présentes lorsque certaines conditions sont rencontrées. L'intensité et la nature des interactions varient selon la nature et la concentration des biopolymères et les conditions du milieu telles le pH, la force ionique et la température.

Les interactions répulsives entre les protéines et les polysaccharides sont majoritairement dues à des effets de volume exclu et à des interactions électrostatiques. Ces interactions sont surtout rencontrées lorsque les biopolymères portent des charges nettes de même signe. Les interactions répulsives entre les protéines et les polysaccharides en mélange peuvent induire une séparation de phases où chacune des phases est enrichie en l'un ou l'autre des biopolymères. Cette immiscibilité peut être exploitée, entre autres, pour créer de nouvelles textures (Syrbe et al., 1998).

Les interactions attractives entre protéines et polysaccharides sont majoritairement de nature électrostatique avec une contribution possible d'interactions hydrophobes, de liens hydrogène ou covalents. Lorsqu'elles sont suffisamment fortes, les interactions attractives entre une protéine et un polysaccharide conduisent à la formation de complexes. La taille et la nature de ces complexes sont variables et dépendent de facteurs intrinsèques aux biopolymères tels que la structure, le poids moléculaire et la densité et la nature des charges portées. Les complexes sont aussi influencés par des conditions du milieu telles que le ratio protéine/polysaccharide, la force ionique, le pH, la température, le cisaillement et la pression. Les interactions attractives entre les protéines et polysaccharides ont été exploitées, entre autres, pour stabiliser les protéines en milieu acide, substituer la matière grasse (Laneuville et al., 2000), purifier des protéines (Dubin et al., 1994), microencapsuler des constituants sensibles (Burgess, 1994) ou encore pour immobiliser des enzymes (Kokufuta, 1992).

Les études portant sur les complexes ont été axées majoritairement sur les applications possibles, notamment sur les propriétés émulsifiante et gélifiante (Tolstoguzov, 1986; Gurov & Nuss, 1986; Gurov et al., 1986; Tokaev et al., 1987; Tolstoguzov, 1991). Peu d'études se sont attardées à la nature des interactions entre les protéines et polysaccharides en milieu dilué (Imeson et al., 1977; Xia et Dubin, 1993; Phillips et Williams, 1995; Tolstoguzov, 1997; Antonov et Soshinsky, 2000 ; Schmitt et al., 2001 ; Sanchez et al., 2002). Les études plus fondamentales ont souvent été réalisées avec des polymères synthétiques ou de poids moléculaire homogène (Gao et al., 1997, 1998; Mattison et al., 1995, 1998, 1999 ; Xia et Dubin, 1993, 1994; Xia et al., 1999).

La caractérisation et la compréhension des interactions entre les protéines et les polysaccharides permettraient d'optimiser leur utilisation dans des domaines aussi variés que l'alimentation, la chimie des biopolymères et le biomédical. L'objectif général de cette recherche était de caractériser les interactions entre les polysaccharides et les protéines à l'aide du modèle β -lactoglobuline/pectine. La plupart des études sur les interactions β -lactoglobuline/pectine ont porté sur des systèmes gélifiés ou concentrés (Ndi et al., 1996a; Beaulieu et al., 2001) où la nature des interactions n'était souvent que l'objet de spéculations (Einhorn-Stoll et al., 1996; Zaleska et al., 2000; Wang et Qvist, 2000). La présente étude porte sur la caractérisation des conditions propices à la complexation entre la β -lactoglobuline et la pectine, l'identification et la quantification des interactions en jeu, la localisation des interactions et l'étude des phénomènes thermodynamiques et cinétiques impliqués lors de la complexation.

1.2 BIOPOLYMÈRES À L'ÉTUDE

1.2.1 La β -lactoglobuline

1.2.1.1 Origine et structure

Les protéines du lactosérum sont définies comme étant les protéines solubles présentes dans le lactosérum suivant une précipitation des caséines à pH 4,6 à 20°C. Ces protéines de lactosérum englobent une première fraction protéique (80%) composée de β -lactoglobuline, d' α -lactalbumine, d'albumine de sérum bovin et d'immunoglobulines, et une deuxième fraction non protéique (20%) composée de protéoses peptones et de composés azotés (De Wit, 1981).

La β -lactoglobuline (β -lg) a une structure bien connue (Sawyer et al., 1999). Elle représente environ 50 à 60% des protéines du lactosérum. Cette protéine est hautement nutritive puisqu'elle contient tous les acides aminés essentiels. Certaines études ont démontré la capacité de la β -lg à lier l'acide rétinoïque ou certains ligands hydrophobes tels que les vitamines liposolubles et les acides gras (Kontopidis et al., 2002; Wu et al., 1999, Qin et al., 1998a; Sawyer et Kontopidis, 2000). Cependant, la fonction biologique réelle de la protéine demeure inconnue (Kontopidis et al., 2002).

La β -lg a un poids moléculaire de 18 362 Da et un point isoélectrique de 5,1. La structure primaire de cette protéine est composée de 162 résidus d'acides aminés (Figure 1.1).

```

1           11           21           31
L I V T Q T M K G L D I Q K V A G T T W S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R
41           51           61           71
V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q K D E N D E C A Q K K I I A E K T K I P A
81           91           101          111
V F K I D A L N E N K V L V L D T D Y K K T L L F C M E N S A E P E Q S L V C Q
121          131          141          151
C L V R T P E V D D E A L E K F D K A L K A L P M H I R L S F N P T Q L E E Q C
161
H I OH

```

Figure 1.1 Structure primaire de la β -lactoglobuline A.

Il existe 7 variants génétiques de cette protéine, les plus communs étant le A et le B qui se différencient par les résidus d'acides aminés en position 64 (aspartyle et glycyle respectivement) et 118 (valyle et alanyle respectivement) (Morr et Ha, 1993).

La structure secondaire de cette protéine contient environ 50% de feuillets β , 15% d'hélices α et 30% d'enroulements au hasard (Figure 1.2) (Sawyer et Kontopidis, 2000). La quantité importante de feuillets β pourrait être responsable d'interactions entre les protéines pouvant aller jusqu'à l'agrégation et la gélification. La structure globulaire de la β -lg, comprenant un cœur hydrophobe, est stabilisée par 2 ponts disulfures en position 60-106 et 65-95 (McKenzie et al., 1972). Les structures tertiaires des variants génétiques A et B de la β -lg sont semblables, conférant au monomère, la forme d'un calice (Figure 1.2).



Source : Protein Data Bank (Qin et al., 1998b)

Figure 1.2 Structure tridimensionnelle d'un monomère de la β -lactoglobuline A.

Le premier pont disulfure, impliqué dans le maintien du cœur hydrophobe, est faiblement accessible et donc peu réactif comparativement au second (Cayot et Lorient, 1998). Cette protéine, très compacte dû à l'empilement des feuillets β , au compactage $\beta\alpha\beta$ et aux ponts disulfures, est très résistante à l'hydrolyse. Selon les conditions du milieu, la structure quaternaire de cette protéine prend la forme de monomères, dimères ou octamères.

1.2.1.2 Influence du milieu sur la structure

Le pH et les minéraux

La structure quaternaire de la β -lg est directement reliée au pH et aux minéraux du milieu. Au pH naturel du lait, soit 6,8, la protéine est présente sous la forme de dimères. L'ajout de chlorure de sodium ou de calcium provoque une augmentation de l'association de ces dimères (Renard et al., 1998).

Un pH supérieur à 8 ou inférieur à 3 conduit à la dissociation des dimères de β -lg en monomères (Ragona et al., 1997). Cette dissociation devient irréversible à pH 9, où la polymérisation des unités protéiques a lieu en partie grâce à l'augmentation de la réactivité du groupement sulfhydryle. Lorsque la protéine passe d'un pH neutre à un pH d'environ 4,5, les dimères peuvent s'associer et former des octamères. La présence d'octamères à ce pH est cependant très faible pour le variant A, et remise en question pour le variant B de la β -lg (McKenzie et Sawyer, 1967; Taulier et Chalikian, 2001). L'ajout de chlorure de sodium ou calcium à ce pH favorise l'association des monomères en dimères.

L'ajout de sels à une solution de β -lg favorise les interactions non polaires en neutralisant les charges de la protéine. Le calcium induit des distortions structurales locales dans la protéine native en formant des ponts intramoléculaires (Jeyarajah et Allen, 1994). Ces ponts calciques augmentent l'hydrophobicité de la protéine et la réactivité des groupements sulfhydryles. L'ajout de calcium dans une solution de β -lg partiellement dénaturée induit la formation d'un gel maintenu par des ponts calciques intermoléculaires (Jeyarajah et Allen, 1994). La valence des ions incorporés à la solution de β -lg joue un rôle important dans le mécanisme de gélification (Kuhn et Foegeding, 1991). Le chlorure de sodium modifie peu l'hydrophobicité de la β -lg et la réactivité des groupements sulfhydryles (Jeyarajah et Allen, 1994). La gélification d'une solution de β -lg en présence de chlorure de sodium est plus lente que celle observée avec le chlorure de calcium (Foegeding et al., 1992).

La température

La protéine adopte la conformation d'un dimère à la température de la pièce. L'effet de la température dépend du pH et de la force ionique du milieu. Lors d'un chauffage entre 50 et 80°C à pH neutre, les dimères de la protéine se dissocient, exposant ainsi un groupement sulfhydryle (Kella et Kinsella, 1988). L'échange de ponts disulfures serait ensuite responsable de la formation d'oligomères et éventuellement d'agrégats maintenus par des interactions hydrophobes. La réactivité des groupements thiols augmente à pH alcalin, atteignant un maximum au pK_a du groupement (9,35). Le déplissement de la protéine permet une accessibilité accrue des groupements sulfhydryles. Les agrégats formés à un pH supérieur ou égal à 6,0 sont solubles. Le chauffage des protéines en milieu acide produit une dénaturation sans agrégation. Un réajustement subséquent du pH à 4,5 conduit à l'insolubilisation des protéines dénaturées (Cayot et Lorient, 1998).

Présence d'autres constituants

La présence de sucres tels le lactose, le glucose, le galactose et le sorbitol atténue l'effet d'un traitement thermique en diminuant les interactions entre les protéines. La dénaturation des protéines est cependant favorisée en présence de sucres réducteurs pouvant être impliqués dans la réaction de Maillard (Morr et Ha, 1993).

1.2.2 La Pectine

1.2.2.1 Origine et structure

La pectine est un polysaccharide des parois cellulaires végétales. L'industrie alimentaire utilise la pectine principalement pour ses propriétés gélifiantes dans des produits tels les confitures et les gelées et pour sa capacité à stabiliser les produits laitiers acides. De plus, la pectine est une fibre alimentaire soluble qui diminuerait les risques de cancer du colon (Nangia-Makker et al., 2002). La pectine disponible sur le marché est majoritairement extraite des résidus de l'industrie du jus de pommes et des écorces de citron.

La pectine est un hétéropolysaccharide anionique ramifié (pK_a 3-4) d'un poids moléculaire situé entre 50000 et 150000 Da (Voragen et al., 1995). Ce caractère anionique de la pectine la rend susceptible aux interactions avec les protéines (Tolstoguzov, 1991). Le squelette de la pectine est composé majoritairement d'unités (200-1000) d'acide D-galacturonique (D-galA) reliées par des liens glycosidiques α -(1 \rightarrow 4). Dans une plus faible proportion (1 à 4%), des unités L-rhamnosés (Rha) liées par des liens α -(1 \rightarrow 2) viennent interrompre la chaîne principale (Figure 1.3).

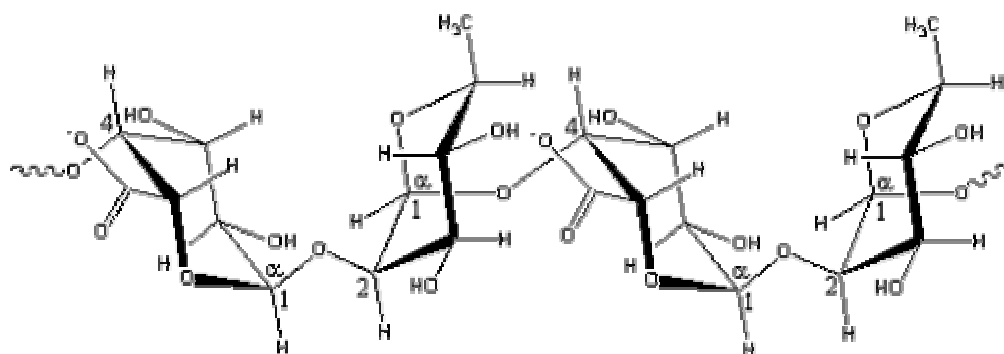


Figure 1.3 Chaîne principale d'une pectine composée d'un enchaînement GalA-Rha-GalA-Rha.

Les zones fortement substituées par ces résidus sont dites hérissées parce qu'elles contiennent les ramifications composées majoritairement de sucres simples tels le L-arabinose, le D-galactose et le D-xylose et minoritairement de D-glucose, D-mannose, L-fucose et D-acide glucuronique. Ces zones hérissées sont séparées par des zones lisses contenant presque exclusivement des résidus D-galA (Figure 1.4).

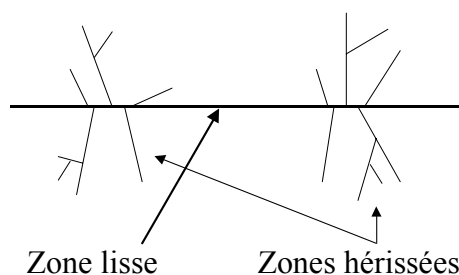


Figure 1.4 Structure schématique de la pectine (adapté de Voragen et al., 1995).

Les zones lisses sont très résistantes à l'hydrolyse acide comparativement aux zones hérissées qui sont beaucoup plus sensibles (Voragen et al., 1995). En plus de l'hydrolyse acide, la pectine peut subir une attaque enzymatique par la polygalacturonase, la pectate-lyase, la pectine lyase, la rhamnogalacturonase, la pectine méthylestérase et la pectine acétylestérase.

La pectine peut avoir différents degrés d'estérification (DE). Le DE est le pourcentage de groupements carboxyles estérifiés par une molécule de méthanol. La pectine d'un DE inférieur à 50% est dite faiblement méthylée (LM), celle dont le DE est supérieur à 50% est dite hautement méthylée (HM) et finalement, lorsque le DE est inférieur à 10%, la pectine est appelée acide pectique. La pectine commerciale peut aussi contenir des groupes amides. Le degré d'amidation est le nombre de groupes carboxyliques amidés par 100 unités D-galA.

La structure tertiaire de la pectine est une hélice tridimensionnelle. La rigidité de la pectine est causée principalement par les monomères D-galA liés par un lien axial-axial (Burton et Brant, 1983). Les groupements méthoxyles n'ont pas d'effet sur la flexibilité du polysaccharide, contrairement au rhamnose dont une faible quantité suffit à l'augmenter. La présence de groupements amides augmente la rigidité des chaînes de la pectine (Axelos et Thibault, 1991).

1.2.2.2 Influence du milieu sur la structure

Le pH

La pectine est stable à des pH entre 3 et 4. À pH plus acide, les groupements méthoxyle et acétyle sont éliminés et les sucres neutres hydrolysés. En milieu très acide, la pectine se décompose en gaz carbonique, en furfural et autres produits de dégradation. En milieu alcalin, les groupements esters de la pectine sont saponifiés. À pH neutre, la saponification est accompagnée d'une réaction de dépolymérisation (Voragen et al., 1995).

Les minéraux

Les ions monovalents se lient de manière électrostatique aux chaînes de pectine alors que les ions divalents entraînent la gélification de la pectine LM par l'intermédiaire de ponts salins. Ces derniers ions peuvent être classés en ordre de compatibilité avec la pectine : $Mg^{2+} \ll Ca^{2+} \sim Sr^{2+} < Ba^{2+}$. En présence d'ions divalents, les chaînes de D-galA se positionnent sur deux dimensions et forment une série de cavités chargées négativement où les ions divalents viennent se loger. Le gel rigide de pectine LM ainsi obtenu est le résultat des interactions entre les groupements carboxyles libres et les ions calcium qui forment des ponts entre les molécules. Ce modèle, connu sous le nom de boîte d'œufs, est controversé par certains auteurs (Axelos et Thibault, 1991 ; Renard et al., 1993). Le mécanisme de gélification de la pectine HM se produit en présence d'une grande quantité de solides totaux (60% de sucre). Le gel formé est maintenu par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène (Walkinshaw et Arnott, 1981).

1.3 LES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES

Les interactions impliquées entre les molécules modifient leur comportement en solution. La force, la spécificité ainsi que la nature attractive ou répulsive des interactions sont variables. Les interactions moléculaires peuvent être classées de par leur nature covalente, électrostatique, due à des forces de van der Waals ou encore à des répulsions stériques (Hiemenz et Rajagopalan, 1997). Les interactions répulsives sont non spécifiques et proviennent de répulsions stériques ou d'interactions électrostatiques. Les interactions attractives peuvent être faibles ou fortes, spécifiques ou non spécifiques. Les liaisons covalentes sont spécifiques contrairement aux interactions électrostatiques, aux forces de van der Waals et aux interactions hydrophobes. Les interactions entre les molécules sont souvent exprimées sous la forme d'énergie potentielle (Prausnitz et al., 1999). L'énergie potentielle entre deux molécules dépend de leur position relative. La force nécessaire pour séparer deux molécules sphériques simples d'une distance intermoléculaire r vers l'infini peut être exprimée par la différence d'énergie potentielle impliquée en fonction de la distance intermoléculaire (1).

$$(1) \quad F = -\frac{\partial \Gamma}{\partial r}$$

Où F : force (N)
 Γ : énergie potentielle (J)
 r : distance intermoléculaire (m)

Ainsi, plus les molécules sont éloignées, plus la force nécessaire à leur séparation est faible. La valeur négative d'énergie potentielle correspond au travail qui doit être effectué pour séparer ces deux molécules.

1.3.1 Liens covalents

Le lien covalent est permanent et spécifique. Il implique le partage d'électrons entre deux ou plusieurs atomes. Le lien covalent est court, entre 0,1 et 0,2 nm, et son énergie potentielle se situe entre 200 et 800 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Israelachvili, 1992).

1.3.2 Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques peuvent être de type ion-ion, ion-dipôle ou dipôle-dipôle. Les dipôles peuvent être permanents ou induits. Les interactions ion-ion sont impliquées entre des molécules possédant une charge électrique permanente. Ces liens ont une longueur variant entre 0,2 et 0,3 nm et ont une énergie potentielle située entre 25 et 50 kJ·mol⁻¹ (Israelachvili, 1992). La force d'interaction dépend des charges des molécules, de la distance entre les molécules et de la constante diélectrique du milieu (Prausnitz et al., 1999). Elle peut être exprimée par l'équation 2.

$$(2) \quad F = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r^2}$$

Où q : charge des molécules (C)
 ϵ_0 : constante diélectrique du vide ($8,85419 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$)
 ϵ_r : constante diélectrique relative (sans unité)

Les interactions électrostatiques ion-ion ont une plus grande portée que les autres types d'interactions électrostatiques (Prausnitz et al., 1999). Les interactions électrostatiques peuvent être répulsives ou attractives selon le signe de la charge. L'énergie potentielle entre deux ions est calculée par l'équation 3.

$$(3) \quad \Gamma_{12} = \frac{z_1 z_2 e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r}$$

Où e : charge élémentaire ($1,60218 \times 10^{-19} \text{ C}$)
 z : valence des ions

Les ponts hydrogène (ponts H) sont un cas particulier des interactions électrostatiques dipôle-dipôle. Les ponts H peuvent aussi être la résultante de forces de van der Waals, de transferts de charges ou encore de répulsions stériques. Les ponts H sont spécifiques et se forment entre un atome électronégatif donneur d'électrons (F, O, N) et un hydrogène lié à un atome électronégatif qui est l'accepteur d'électrons. La force des ponts H dépend de l'électronégativité et de l'orientation des donneurs et accepteurs d'électrons. Les ponts

hydrogène ont une énergie potentielle entre 10 et 40 kJ·mol⁻¹ et une longueur entre 0,2 et 0,3 nm (Israelachvili, 1992).

1.3.3 Forces de van der Waals

Les forces de van der Waals surviennent entre des molécules non polaires. Les forces de van der Waals sont des interactions dipôle induit-dipôle permanent, dipôle induit-dipôle induit et dipôle permanent-dipôle permanent (Dickinson et McClements, 1996). Elles sont le résultat d'un moment dipolaire induit dans une molécule par la position asymétrique des nuages d'électrons autour des protons. Le dipôle instantané créé peut ensuite interagir avec les électrons d'une molécule voisine et induire un autre dipôle. La force résultante entre les dipôles est attractive. La longueur des liaisons est située entre 0,1 et 0,4 nm et leur énergie potentielle est située entre 1 et 20 kJ·mol⁻¹ (Israelachvili, 1992). La force de ces interactions est donnée par l'équation 4.

$$(4) \quad F = \frac{-B}{(4\pi\epsilon_R\epsilon_0)^2 r^6}$$

Où B : constante dépendante de l'origine de l'interaction

1.3.4 Forces de dispersion de London

Les oscillations des électrons autour du noyau peuvent induire un moment dipolaire dû à une distorsion du nuage d'électrons. Bien que la moyenne de ces moments dipolaires temporaires soit nulle, ils sont suffisants pour induire l'apparition de dipôles sur les molécules voisines (Prausnitz et al., 1999). L'énergie potentielle des forces de London entre deux molécules sphériques et symétriques notées 1 et 2 est donnée par l'équation 5.

$$(5) \quad \Gamma_{12} = -\frac{3}{2} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \left(\frac{h\nu_{01} h\nu_{02}}{h\nu_{01} + h\nu_{02}} \right)$$

Où h : constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J·s)
 ν_0 : fréquence électronique des molécules excitées (Hz)
 α : constante de polarisabilité ($C^2 \cdot m^2 \cdot J^{-1}$)

Le paramètre v_0 est relatif à la variation de l'indice de réfraction (n) avec la fréquence de la lumière (ν). L'énergie potentielle entre des molécules non polaires est indépendante de la température. Elle diminue rapidement avec l'éloignement des molécules puisqu'elle est inversement proportionnelle à r^6 , comparativement à r^2 dans le cas de molécules ioniques.

1.3.5 Répulsions stériques

Lorsque deux atomes sont proches l'un de l'autre, le recouvrement des nuages d'électrons crée une force répulsive les empêchant de s'approcher davantage. Cette force répulsive croît lorsque la distance entre les atomes devient inférieure à leur rayon. Les forces impliquées entre des molécules non sphériques dépendent aussi de leur orientation relative (Prausnitz et al., 1999). Par exemple, une molécule linéaire aura un point d'ébullition plus élevé qu'une molécule semblable mais ramifiée. Les ramifications diminuent les interactions intermoléculaires en empêchant l'alignement des molécules. De ce fait, l'énergie cinétique nécessaire à un changement de phases est moindre.

1.3.6 Interactions hydrophobes

Lorsque des molécules non polaires sont introduites dans un milieu aqueux, les molécules d'eau se réarrangent de manière à former des structures tétraédriques maintenues par des ponts hydrogène polaires (Dickinson et McClements, 1996). En maximisant le nombre de ponts hydrogène, l'eau « isole » les molécules non polaires. Les interactions hydrophobes sont en fait des forces indirectes qui favorisent le regroupement de molécules non polaires suite à des interactions entre des molécules polaires.

Les différents types d'interactions décrites dans cette section sont impliquées en proportions diverses dans les systèmes ternaires protéine/polysaccharide/eau. Plusieurs approches théoriques ont tenté d'expliquer et de prédire le comportement des solutions polymériques. La grande variabilité des structures moléculaires et des conditions environnantes limitent souvent l'application d'une théorie à quelques cas particuliers. La

section suivante présente les théories générales à la base de la thermodynamique des polymères en solution.

1.4 LES SOLUTIONS DE POLYMÈRES

1.4.1 Principes de thermodynamique

La première loi de la thermodynamique démontre que l'énergie d'un système est conservée sous une forme ou une autre et ce peu importe les réactions impliquées. La deuxième loi de la thermodynamique exprime la tendance d'un système vers une augmentation d'entropie. L'énergie libre de Gibbs (G) est une équation d'état qui met en relation les deux premières lois de la thermodynamique lorsqu'une réaction se produit à température et pression constantes (6). L'énergie molaire libre de Gibbs correspond au potentiel chimique (μ) pour les substances pures et les gaz parfaits. Lorsque la température et le volume d'un système sont constants, l'énergie de Gibbs peut être remplacée par l'énergie libre de Helmholtz (A) calculée par l'équation 7.

$$(6) \quad G = H - TS$$

$$(7) \quad A = U - TS$$

Où H : enthalpie (J)
 S : entropie ($J \cdot K^{-1}$)
 U : énergie interne (J)
 T : température (K)

Les énergies libres de Gibbs et de Helmholtz permettent de connaître la spontanéité d'une réaction. Une réaction est spontanée lorsque le ΔG ou le ΔA est de signe négatif alors qu'elle est défavorisée lorsque le ΔG ou le ΔA est positif. Lorsque le ΔG ou le ΔA est nul, la réaction en cours est à l'équilibre. L'équation d'état de l'énergie de Gibbs (6) démontre qu'une réaction est favorisée lorsque la différence d'entropie (ΔS) est positive et/ou lorsque la différence d'enthalpie (ΔH) est négative. L'énergie libre de Gibbs est la propriété thermodynamique la plus utilisée lors de l'étude de la stabilité de solutions composées de solvants et de solutés de nature alimentaire.

1.4.2 Loi de Raoult

La loi de Raoult est la première approche empirique développée pour des solutions simplifiées. Ces solutions dites idéales doivent avoir une enthalpie de mélange nulle. Elles doivent être composées d'un solvant et d'un soluté ayant des molécules de même taille. Le volume total des solutions doit être égal à la somme des volumes individuels des composés. La miscibilité des constituants d'une solution idéale doit être favorisée uniquement par une augmentation de l'entropie du système. L'activité du solvant (a_1) d'une solution idéale doit être égale à sa fraction molaire (x_1) ce qui implique que le système doit être en condition très diluée.

La loi de Raoult décrit le comportement des solutions idéales en affirmant que la pression de vapeur partielle d'un des composés de la solution est proportionnelle à sa fraction molaire (8).

$$(8) \quad p_1 = p_1^0 x_1$$

Où p_1 : pression partielle du solvant (Pa)
 p_1^0 : pression du solvant pur (Pa)
 x_1 : fraction molaire du solvant

Selon la loi de Raoult, l'entropie de mélange (ΔS_m) d'une solution idéale composée d'un solvant et d'un soluté est calculée par l'équation 9.

$$(9) \quad \Delta S_m = -k(N_1 \ln x_1 + N_2 \ln x_2)$$

Où k : constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{molécule}^{-1}$)
 N_1 et N_2 : nombre de molécules de solvant et du soluté
 x_1 et x_2 : fractions molaires du solvant et soluté

D'après l'équation 9, la formation d'une solution idéale est toujours spontanée. En effet, l'énergie de Gibbs de mélange (ΔG_m) décrite par l'équation 6 est négative en toutes conditions puisque la différence d'enthalpie de mélange (ΔH_m) d'une solution idéale est nulle et l'entropie de mélange (ΔS_m) toujours supérieure à zéro.

Les solutions de polymères obéissent à la loi de Raoult de manière asymptotique et seulement à des concentrations très faibles (Prausnitz et al., 1999). La loi de Raoult ne peut décrire les solutions de polymères de par l'utilisation de la fraction molaire comme variable de composition des solutions. La loi de Raoult prévoit que l'effet d'une macromolécule sur le solvant sera le même que celui d'une molécule simple.

Les solutions de polymères s'écartent de l'idéalité pour plusieurs raisons. Premièrement, les monomères ont des positions fixes et non aléatoires sur la chaîne de polymère. Deuxièmement, les polymères évitent de s'interpénétrer dû à leurs chaînes plus ou moins flexibles. Troisièmement, le ΔH_m d'une solution de polymère n'est pas toujours nul (Prausnitz et al., 1999). Bien que peu applicable aux solutions réelles, la loi de Raoult reste toutefois la référence de plusieurs modèles théoriques adaptés aux macromolécules.

1.4.3 Les théories matricielles

Les théories matricielles sont un ensemble de théories assumant que les liquides adoptent une structure partiellement rigide (Barker, 1963). Selon ces théories, le mouvement des molécules à l'état liquide n'est pas entièrement libre et aléatoire, mais limité à une zone déterminée contenue dans une matrice. Ces théories expliquent les sources de déviation des solutions réelles par rapport aux solutions idéales par une enthalpie de mélange non nulle. Cette variation d'enthalpie lors du mélange des molécules est due à la présence de forces attractives et répulsives entre les molécules d'espèces différentes, lesquelles varient en intensité par rapport à celles observées entre les molécules de même espèce. De plus, les entropies de mélanges s'écartent de l'idéalité en raison de la différence entre les tailles des molécules. En effet le mélange de molécules de tailles diverses entraîne une réorganisation différente de celle observée dans les solutions pures.

La théorie matricielle peut s'illustrer par le mélange d'un solvant (1) contenant N_1 molécules et d'un soluté (2) contenant N_2 molécules (Figure 1.5) (Prausnitz et al., 1999). Les molécules 1 et 2 sont considérées sphériques, symétriques et de mêmes tailles. La matrice est faite de « cellules » de mêmes dimensions (représentées par les cases), également séparées et ne pouvant contenir qu'une molécule de solvant ou de soluté.

Chacune des molécules de liquide est dans une cellule où le seul mouvement permis est la vibration. Le nombre de voisins immédiats est appelé nombre de coordination (z). Le nombre de coordination varie entre 6 et 12 et dépend de l'organisation tridimensionnelle des molécules. Trois types de paires de voisins peuvent exister : 1-1, 2-2 et 1-2. Les théories matricielles s'appliquent aux solutions où le volume final est égal à la somme des volumes individuels des substances pures. Elles considèrent que la taille et la structure chimique des molécules de solvant et de soluté sont semblables. La position des molécules sur la matrice peut alors être considérée comme aléatoire. Les théories matricielles ne peuvent toutefois s'appliquer aux solutions de polymères puisque la taille des molécules ainsi que les interactions existant entre ces molécules, ne sont pas prises en compte.

2	2	1	1	1	1	2	1
1	1	2	1	2	1	1	1
2	1	2	2	1	1	1	1
1	1	1	1	2	1	2	1
2	1	1	2	1	1	1	1
1	1	1	1	1	2	1	1

Figure 1.5 Théorie matricielle pour une solution réelle. Molécules de solvant (1), molécules de soluté (2).

1.4.4 La théorie de Flory-Huggins

La théorie de Flory-Huggins est basée sur les théories matricielles (Prausnitz et al., 1999). Flory (1942) et Huggins (1942) ont développé, indépendamment, une expression de l'entropie combinatoire de mélange s'appliquant aux molécules à chaînes flexibles dont les tailles sont différentes. Cette théorie est le premier modèle adapté aux solutions de polymères. La théorie de Flory-Huggins ne peut décrire précisément les propriétés thermodynamiques des solutions. Elle permet toutefois de prédire la stabilité d'une solution de macromolécules par rapport à celle observée dans une solution de molécules simples. La théorie de Flory-Huggins est aujourd'hui considérée comme la pierre angulaire de la

thermodynamique des polymères en solution. Elle est à la base de plusieurs modèles modernes spécifiques aux solutions macromoléculaires.

Contrairement aux théories matricielles, la théorie de Flory-Huggins permet de décrire le comportement de solutions de polymères (Flory, 1953). Tout comme les théories matricielles, les solutions contenant N_1 molécules de solvant et N_2 molécules de soluté sont représentées sous forme de matrices semi-solides composées de cellules d'égales dimensions (Figure 1.6). Les molécules de solvant sont considérées comme sphériques alors que le polymère est considéré comme étant composé de chaînes flexibles. Les chaînes flexibles sont composées de r segments mobiles d'une taille équivalente à celle d'une molécule de solvant. Le nombre de cellules dans la matrice est égal à $N_1 + rN_2$. Une cellule peut contenir soit une molécule de solvant, soit un segment de molécule de soluté. L'entropie du système est inférieure à celle du modèle monomérique décrit précédemment et diminue drastiquement avec une augmentation de la longueur des chaînes du polymère. En effet, le nombre de conformations possible est limité par les segments d'une même molécule de polymère, lesquels doivent occuper des cellules adjacentes (Figure 1.6).

2	2	2	2	1	1	1	1
1	1	1	2	1	1	1	1
1	1	1	2	2	2	2	1
1	1	1	1	1	1	2	1
1	1	1	1	1	1	2	1
1	1	1	1	1	1	1	1

Figure 1.6 Modèle de Flory-Huggins. Molécules de solvant (1), segments de polymère (2).

Les fractions des cellules occupées par des molécules de solvant (Φ_1^*) ou des segments de polymère (Φ_2^*) sont calculées par l'équation 10 (Prausnitz et al., 1999).

$$(10) \quad \Phi_1^* = \frac{N_1}{N_1 + rN_2} \quad \text{et} \quad \Phi_2^* = \frac{N_2}{N_1 + rN_2}$$

1.4.4.1 Enthalpie de mélange nulle

La théorie de base de Flory-Huggins considère que la formation d'une solution ne demande ni ne dégage d'énergie ($\Delta H_m=0$). L'équation 6 décrivant l'énergie libre de Gibbs peut donc être résolue uniquement par la mesure de l'entropie de mélange. L'énergie libre de Gibbs et l'entropie combinatoire sont données par l'équation 11.

$$(11) \quad -\frac{\Delta G_m}{RT} = \frac{\Delta S_m}{R} = -(N_1 \ln \Phi_1^* + N_2 \ln \Phi_2^*)N_A$$

Bien que la théorie de Flory-Huggins tienne compte du rapport entre la taille du polymère et la taille du solvant, elle néglige l'effet d'une différence de conformation des molécules. Les entropies de molécules de mêmes poids moléculaires mais de structures linéaire, ramifiée et hélicoïdale seront identiques (Prausnitz et al., 1999).

1.4.4.2 Enthalpie de mélange non nulle

Le terme χ , appelé paramètre de Flory-Huggins, a été introduit dans la théorie de base afin de pouvoir l'appliquer aux solutions dont le ΔH de mélange n'est pas nul (Flory, 1953). C'est le signe du paramètre de Flory-Huggins χ qui permet de prédire si les composés seront miscibles. L'enthalpie de mélange en excès est proportionnelle au volume de la solution et au produit des fractions volumiques. L'énergie libre de Gibbs de mélange est obtenue par l'équation 12.

$$(12) \quad \frac{\Delta G_m}{N_A RT} = N_1 \ln \Phi_1^* + N_2 \ln \Phi_2^* + \chi \Phi_1^* \Phi_2^* (N_1 + rN_2)$$

Dans un système binaire, le paramètre de Flory-Huggins dépend des forces impliquées entre le solvant et le polymère. En fait, ce paramètre permet de caractériser les interactions solvant-solvant (χ_{11}), segment-segment (χ_{22}) et solvant-segment (χ_{12}). Le paramètre χ est calculé à l'aide de l'équation 13.

$$(13) \quad \chi = \frac{w}{kT}$$

Le paramètre w ($\text{J}\cdot\text{segment}^{-1}$) est l'énergie nécessaire à l'interversion de deux segments de polymère dans la matrice. Le paramètre de Flory-Huggins peut aussi être déterminé pour un système ternaire où l'interaction entre 2 polymères différents peut être mesurée. Il a toutefois été démontré que le paramètre de Flory-Huggins peut être influencé par la concentration et le poids moléculaire du polymère (Prausnitz et al., 1999). L'énergie d'interversion est indépendante de la température, alors que le paramètre de Flory-Huggins est inversement proportionnel à la température. Lorsque les solutions sont athermales, le paramètre χ est nul. Lorsque la solution est un mélange de composés semblables du point de vue chimique, le paramètre χ est petit par rapport à 1.

La théorie de Flory-Huggins permet de prédire la stabilité des systèmes polymère/solvant à basse température. L'entropie combinatoire qui est toujours positive favorise le mélange. Lorsque χ est positif, il existe une limite de température en dessous de laquelle le système devient instable. Les molécules 1 et 2 sont miscibles si le paramètre χ est inférieur au second terme de l'équation 14.

$$(14) \quad \chi \leq \frac{1}{2} \left(1 + \frac{1}{\sqrt{r}} \right)^2$$

Lorsque l'égalité de l'équation 14 est observée, le paramètre de Flory-Huggins est appelé paramètre critique; il est alors symbolisé par χ^c . Le paramètre critique χ^c survient à une composition critique de la solution (Flory, 1953). Cette composition critique correspond à la fraction molaire du soluté et est calculée par l'équation 15.

$$(15) \quad \Phi_2^{*c} = \frac{1}{1 + \sqrt{r}}$$

Les solutions de polymères, dont le nombre de segments par chaîne de polymère est très grand, ont une valeur de paramètre critique χ^c approximative de 0,5. La composition critique d'une solution est située à de très faibles concentrations en polymère et tend vers

zéro lorsque le nombre de segments tend vers l'infini. Lorsque les chaînes de polymère ont un nombre de segments égal à 1, le paramètre critique χ^c est égal à 2 et la composition critique de la solution est égale 0,5 (Prausnitz et al., 1999).

La température critique où une séparation de phases est observée est symbolisée par T_c . Lorsque la température est supérieure à T_c , le mélange ne forme qu'une seule phase stable, alors que pour une température inférieure à T_c , deux phases stables sont obtenues. Lorsque le polymère a un poids moléculaire infini, la température critique de séparation de phases est symbolisée par θ . Puisque χ est inversement proportionnel à la température on obtient l'équation 16.

$$(16) \quad \frac{\chi(T)}{\chi^c(T_c)} = \frac{\theta}{T}$$

Cette équation peut être utilisée pour connaître χ en fonction de la température lorsque le poids moléculaire du polymère est très élevé.

Lorsque le paramètre de Flory-Huggins χ est positif, il existe une répulsion nette entre les molécules. Cette répulsion peut être due à une répulsion stérique, à des interactions électrostatiques répulsives ou à un effet de volume exclu. Lorsque la solution contient plus d'un polymère, la répulsion peut entraîner une séparation de phases dite ségrégative où chacune des phases est enrichie en l'un ou l'autre des polymères. Lorsque le paramètre χ est négatif, il existe une attraction nette entre les molécules. Lorsque l'interaction est assez forte, il peut y avoir séparation de phases dite associative où les molécules de polymères complexées forment une phase distincte de la phase contenant le solvant.

La théorie de Flory-Huggins est la théorie la plus utilisée dans le domaine de la thermodynamique des solutions de polymères. Cette théorie présente toutefois quelques lacunes dont celle d'utiliser une densité moyenne des segments des chaînes de polymère. La théorie de Flory-Huggins est aussi limitée par l'utilisation d'un même nombre de

coordination pour toutes les molécules, négligeant ainsi leurs géométries individuelles (Prausnitz et al., 1999).

1.5 INCOMPATIBILITÉ ET COMPATIBILITÉ THERMODYNAMIQUE

1.5.1 Cas particulier des interactions protéine/polysaccharide

Les paramètres d'interaction χ de la théorie de Flory-Huggins permettent de connaître la nature attractive ou répulsive entre deux polymères. Le rapport entre l'enthalpie et l'entropie de mélange est grandement influencé par la concentration en polymère et détermine s'il y aura une séparation de phases. Lorsque la concentration en polymère est très faible, le gain d'entropie dû à la liberté de mouvement du polymère compense pour la contribution de l'enthalpie, on obtient donc un système homogène. Lorsque la concentration augmente, un faible effet endothermique sera suffisant à induire la séparation de phases même si l'énergie libre de mélange ΔG_m n'est pas positive.

Lorsqu'une protéine et un polysaccharide anionique sont dans une même solution, trois types de comportement peuvent être observés. Premièrement, les deux polymères peuvent être en deux phases distinctes sans interagir, où chacune des phases est enrichie en l'un ou l'autre des polymères. Cet état, appelé incompatibilité thermodynamique ou séparation de phases ségrégative, existe lorsque les interactions entre polymères d'une même nature sont favorisées au détriment de celles entre polymères de natures différentes. L'incompatibilité dépend des charges relatives sur chaque polymère, du pH, de la flexibilité des chaînes du polysaccharide, du poids moléculaire des polymères, de la concentration en sels ainsi que de la concentration en solides totaux.

Le deuxième cas, rarement observé, se produit lorsque les macromolécules forment un mélange homogène spontané sans interagir. Cet état de co-solubilité est en constante compétition avec celui d'incompatibilité thermodynamique. Plus l'écart entre les poids moléculaires des macromolécules augmente, plus le déséquilibre entre les forces attractives et répulsives s'accroît, et plus il y a de risques de voir une incompatibilité entre les polymères. Seuls quelques exemples de co-solubilité ont été rapportés dans la littérature,

dont le cas de l'albumine de sérum bovin (BSA) et de la pectine (Semenova et al., 1991). Ce système est stable de pH 3 à 8 et de 0,1 à 1,0 M de NaCl, et devient instable en présence de 6 M d'urée. Les deux polymères sont maintenus non seulement par des interactions électrostatiques, mais aussi par des liaisons hydrogène.

Troisièmement, il peut y avoir présence de deux phases où les polymères de charges opposées se retrouvent principalement dans la même phase. Cette compatibilité thermodynamique, ou séparation de phases associative, est caractérisée par la formation d'un complexe protéine/polysaccharide, aussi appelé cocervat, maintenu majoritairement par des interactions électrostatiques. Les interactions entre polysaccharides et protéines ont fait l'objet d'études visant à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de complexes et leurs applications possibles (Hill et Zadow, 1974; Ledward, 1979; Tolstoguzov, 1986). La structure des complexes d'albumine de sérum bovin (BSA) et de poly(chlorure de diméthylallylammonium) (PDMAAC) serait celle d'une chaîne de polysaccharide chargée négativement où plusieurs protéines chargées positivement viendraient s'y fixer (Xia et Dubin, 1993; Mattison et al., 1995). Les modèles de Overbeek-Voorn (1957) et de Veis-Aranyi (1960) sont les deux principales théories décrivant le phénomène de compatibilité thermodynamique. Elles sont bien résumées et expliquées dans les ouvrages de Burgess (1990) et de Schmitt et al. (1998).

La théorie de Overbeek-Voorn est basée sur les interactions entre la gomme arabique et la gélatine en solution. Selon cette théorie, la complexation est un phénomène spontané résultant d'un équilibre entre des interactions électrostatiques attractives et une entropie favorisant l'éloignement des molécules. La formation d'un complexe permet d'emprisonner des molécules d'eau et ainsi d'augmenter le nombre de configurations possibles dans le complexe. La théorie de Overbeek-Voorn utilise l'équation de Debye-Huckel et la théorie matricielle de Flory-Huggins pour décrire les interactions électrostatiques et le terme d'entropie, respectivement. La compatibilité thermodynamique requiert un poids moléculaire (r) et une densité de charge (α) minimales. Les auteurs ont démontré qu'un système polyélectrolyte/eau était compatible lorsque $\alpha^3 r \geq 0,53$. La validité de cette théorie repose sur plusieurs présomptions : les interactions solvant-soluté sont négligeables, les

charges sont distribuées uniformément dans la solution, les interactions entre les polymères sont non spécifiques et les chaînes des polymères doivent adopter une structure enroulée au hasard. La théorie de Nakajima-Sato (1972) reprend la théorie de Overbeek-Voorn en y incluant un terme d'interaction de Huggins.

La théorie de Veis-Aranyi se base sur le cas d'une solution contenant deux gélatines portant des charges de signes opposés, dont le comportement n'avait pu être décrit d'une manière satisfaisante par la théorie de Overbeek-Voorn. Selon la théorie de Veis-Aranyi, la complexation se produit en deux étapes. La première étape est caractérisée par la formation spontanée d'agrégats intrapolymériques solubles sous l'action de forces électrostatiques attractives. Un agrégat intrapolymérique est composé d'une macromolécule interagissant avec une ou plusieurs molécules d'un ligand de taille inférieure. Ces agrégats moléculaires occupent un volume semblable à celui occupé par la macromolécule. Ils sont maintenus par des liens ioniques spécifiques ont une faible entropie de configuration. La complexation proprement dite survient lors d'une deuxième étape qui peut durer jusqu'à quelques jours. Cette étape est favorisée par un gain d'entropie lors de la dilution de la phase contenant les agrégats solubles, lesquels se réorganisent aléatoirement dans une phase concentrée en complexes interpolymériques insolubles. La théorie de Veis-Aranyi tient compte des interactions soluté-solvant en incluant le paramètre χ_{12} de Flory-Huggins. Le terme électrostatique utilisé dans la théorie de Overbeek-Voorn est remplacé par un terme tenant compte de la densité de charge du polymère et de sa fraction volumique. Ce terme représente la différence d'énergie libre lors du transfert d'un segment de chaîne, d'un milieu dilué à un milieu concentré.

La théorie de Tainaka (1979) a été développée sur les bases de la théorie de Veis-Aranyi. Elle est plus générale puisqu'elle n'est pas limitée aux systèmes à faible densité de charges. Le paramètre de Flory-Huggins, qui est utilisé pour la phase diluée dans la théorie de Veis-Aranyi, est maintenant aussi appliqué à la phase concentrée. Contrairement à la théorie de Veis-Aranyi, les interactions impliquées lors de la formation des agrégats solubles sont non spécifiques. La deuxième étape est caractérisée par la condensation de la phase diluée contenant les agrégats pour former une phase concentrée en complexes. Les

agrégats solubles sont donc présents dans les deux phases. Selon Tainaka, la force principale conduisant à la séparation de phases est de nature électrostatique attractive. La formation d'un complexe est favorisée par le gain d'énergie électrostatique provenant d'une augmentation de la densité ionique lorsque des zones chargées des agrégats sont à proximité.

1.5.2 La formation de complexes

La formation de complexes entre une protéine et un polysaccharide est un cas particulier des interactions macromoléculaires en solution. Les interactions impliquées entre ces biopolymères peuvent être répulsives et non spécifiques et provenir de l'effet d'interactions électrostatiques et/ou de volume exclu. Le volume exclu désigne la diminution de l'espace occupé dans la solution par l'un et l'autre des polymères et ce, lorsque les interactions entre les molécules de même nature sont favorisées au dépend des interactions entre des molécules différentes. Les interactions attractives peuvent être faibles ou fortes, spécifiques ou non spécifiques. Les liaisons covalentes sont spécifiques contrairement aux liaisons ioniques, aux forces de van der Waals, aux interactions hydrophobes et aux liaisons hydrogène. Il peut y avoir une interaction électrostatique entre des macromolécules d'une charge nette de même signe par l'intermédiaire de zones portant des charges de signe opposé (Xia et Dubin, 1994).

Bien que les interactions électrostatiques soient majoritaires lors de la formation des complexes (van Oss, 1993; Samant et al., 1993), des forces d'autres natures sont impliquées dans certains systèmes. Par exemple, la formation de complexes pectine/gélatine à un pH supérieur au pI de la protéine et à une force ionique supérieure 0,2 pouvait s'expliquer uniquement par la présence d'interactions électrostatiques. En fait, la présence d'une température critique de miscibilité (20°C) du système gélatine/pectine a permis de détecter la présence de liens hydrogène, favorisés à basse température (Chen et al., 1989). D'autre part, le traitement thermique des complexes protéine/polysaccharide a permis d'améliorer leur stabilité lors de variations de pH ou de force ionique, et cette amélioration a été associée à des interactions hydrophobes (Chen et al., 1989). Les observations effectuées

dans le cadre de telles études restent à confirmer par la caractérisation des interactions protéine/polysaccharide impliquées.

1.5.3 Facteurs influençant la nature des complexes

1.5.3.1 Charge des macromolécules

La formation de complexes est influencée majoritairement par la nature et la densité des charges présentes sur les deux macromolécules. Une faible densité de charges inhibe la formation des complexes, alors qu'une forte densité peut induire une précipitation ou une gélification. La charge résiduelle nette influence la solubilité des complexes obtenus. Les complexes sont solubles lorsque la charge d'une des macromolécules en excès permet d'interagir avec le solvant. Les complexes sont insolubles lorsque les charges des macromolécules sont égales et opposées; ils peuvent être solubilisés par un titrage acide, effectué à faible force ionique (Xia et Dubin, 1994; Mattison et al., 1995; Tolstoguzov, 1997).

1.5.3.2 Le pH

Le pH agit sur la charge des complexes en influençant le degré d'ionisation des groupes amines et carboxyliques. Une forte concentration en sels inhibe la formation de complexes en créant un effet d'écran électrostatique. De même, une force ionique insuffisante inhibe la complexation. En effet, la forte charge portée par les macromolécules induit une modification de leur configuration de manière à favoriser la formation d'agrégats et ce, au détriment des complexes (Singh et Burgess, 1989; Burgess, 1990). Le ratio protéine/polysaccharide est un troisième facteur influençant la charge nette et les propriétés du complexe obtenu. Ce ratio est le facteur ayant le plus d'influence sur la solubilité des complexes.

1.5.3.3 Nature du polysaccharide

Les polysaccharides anioniques n'ont pas tous le même degré de compatibilité avec les protéines. Les polysaccharides sulfatés se lient plus fortement à une protéine au dessus de son point isoélectrique, que les polysaccharides carboxylés. Ceci s'explique par la force de l'interaction entre les groupes OSO_3^- et NH_3^+ qui permet la formation de complexes même lorsque la protéine et le polysaccharide sont tous deux chargés négativement. Les polysaccharides qui possèdent des groupes carboxylés ne complexent pas les protéines globulaires à une force ionique supérieure à 0,2, ou encore à des valeurs de pH largement supérieures au point isoélectrique des protéines. L'action de ces polysaccharides se caractérise principalement par la diminution des interactions protéine/protéine.

1.5.3.4 Poids moléculaire

Lorsque les interactions électrostatiques entre protéine et polysaccharide sont très fortes, l'effet du poids moléculaire du polysaccharide sur la quantité de protéines complexées est négligeable (Morr et Ha, 1993). Lorsque ces interactions sont faibles, un polysaccharide de poids moléculaire élevé complexe une plus grande quantité de protéines; le plus grand espace occupé dans la solution favorise alors le contact avec la protéine (Semenova, 1996). Les protéines d'un grand poids moléculaire ont tendance à former des gels ou des précipités plutôt que des complexes. Les molécules de faible poids moléculaire interagissent par appariement ionique, plutôt que par complexation, conduisant à la formation d'agrégats moléculaires.

1.5.3.5 Influence du milieu sur la structure

La température influence la formation de complexes en favorisant les interactions hydrophobes et covalentes à haute température et les liens hydrogène à basse température (Stainsby, 1980). L'application d'une pression hydrostatique facilite aussi la formation de complexes. En effet, ce traitement mène à la dénaturation partielle des protéines et permet l'exposition de sites réactifs, initialement enfouis dans la molécule (Dickinson et Pawlowski, 1996). Dans le cas des hautes pressions dynamiques, elles réduisent la taille des

complexes par l'action de forces de turbulence, de cavitation et de cisaillement (Le Hénaff, 1996). La durée d'un traitement de cisaillement influence également la taille des complexes. Plus il est long, plus les probabilités de collisions augmentent et plus les complexes auront une grande taille (Schmitt et al., 1998).

1.5.3.6 Méthode de fabrication

Les complexes ont des propriétés différentes selon le mode de fabrication. Les complexes titrés « T » sont formés lorsque le mélange des solutions de protéine et polysaccharide s'effectue à un pH où les molécules portent des charges nettes de même signe suivi par une acidification lente (polysaccharide anionique). Les complexes mélangés « M » sont obtenus en mélangeant les solutions de protéine et polysaccharide à pH acide, où les deux molécules portent des charges nettes de signes opposés (Tolstoguzov, 1986). Les complexes M sont moins solubles que les complexes T puisqu'ils sont formés rapidement en limitant la structuration de la solution. La formation de complexes est un phénomène réversible, les complexes M peuvent donc être solubilisés en titrant la solution protéine/polysaccharide par une base.

1.5.4 Cinétique de la séparation de phases

La compatibilité et l'incompatibilité peuvent entraîner une séparation de phases dite associative et ségrégative, respectivement. La cinétique de ces séparations de phases varie selon les systèmes.

La décomposition spinodale est le mécanisme de séparation de phases des solutions en zone instable du diagramme de phases. Une énergie libre négative entraîne une déstabilisation spontanée du système, caractérisée par l'apparition d'un réseau biphasique interconnecté (Figure 1.7A). La décomposition spinodale débute par une augmentation rapide du nombre des domaines structuraux de même taille, dont l'interface devient mieux définie. Par la suite, une fluctuation périodique de la composition entraîne une croissance des domaines structuraux, dont la concentration n'a pas encore atteint l'équilibre (Sanchez et al., 2002).

Un mécanisme de nucléation et croissance est observé lorsqu'un mélange est dans la zone métastable du diagramme de phases (Figure 1.7B). La nucléation et croissance se distingue de la décomposition spinodale par le développement différent des fluctuations de concentrations. Un système en zone métastable supporte de faibles variations de concentrations puisqu'une barrière énergétique empêche la séparation de phases (Sanchez et al., 2002). Une déstabilisation par nucléation et croissance débute par la formation aléatoire de noyaux enrichis en composant A de tailles supérieures à une valeur critique (Figure 1.7B). Lorsque les noyaux sont présents en certain nombre, une rapide séparation de phases se produit. La solution déstabilisée est alors composée de particules enrichies d'un composant A, dispersées dans une autre phase continue enrichie d'un composant B. Par la suite, les grandes particules auront tendance à croître au profit des plus petites, par les mécanismes de coalescence ou de maturation d'Ostwald.

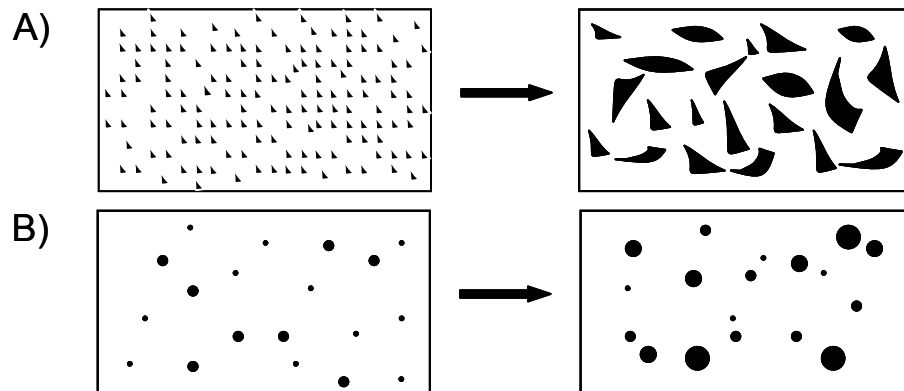


Figure 1.7 Schématisation de la décomposition spinodale (A) et de la nucléation et croissance (B).

1.5.5 Le système β -lactoglobuline/pectine

Les études effectuées sur les interactions entre les polysaccharides et les protéines du lactosérum sont peu nombreuses. En 1985, Serov et al. ont étudié la récupération de ces protéines dans le lactosérum à l'aide de la pectine. Syrbe et al. (1998) ont démontré que le chauffage des protéines de lactosérum à pH neutre, en présence de pectine HM, permet la formation d'un gel mixte où les espèces n'interagissent pas. Étonnamment, le chauffage de

la β -lg en présence de polypectate de sodium à pH 6,5 a plutôt induit la formation d'agrégats protéiques de haut poids moléculaire (Ndi et al., 1996b). Un deuxième résultat inattendu concerne la diminution de la complexation des protéines lors d'un chauffage à pH 3,5. Les auteurs attribuent ces phénomènes particuliers à la présence d'interactions protéine/protéine et protéine/polysaccharide non caractérisées. Ndi et al. (1996a) ont démontré que la présence de calcium influence les interactions entre les protéines de lactosérum et la pectine LM. À pH 3,5, les ions calcium diminuent la quantité de complexes formés en favorisant les interactions pectine/pectine alors qu'à pH 6,5, ils augmentent l'homogénéité du gel formé en réduisant les forces de répulsion entre les deux polymères en zone d'incompatibilité thermodynamique. D'autre part, Einhorn-Stoll et al. (1996) ont observé une amélioration de la stabilité d'une émulsion contenant un concentré de protéines de lactosérum en présence de pectine. Dans cette étude, la pectine LM, plus chargée, a formé plus de complexes à l'interface huile/eau conférant ainsi une meilleure stabilité à l'émulsion. Malgré l'intérêt suscité par les travaux portant sur le système β -lg/pectine, aucune étude n'a porté sur la caractérisation des interactions impliquées en fonction de différentes conditions de pH et de force ionique. Les travaux réalisés sur ce système ont porté majoritairement sur des systèmes gélifiés.

1.6 TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION

L'étude des systèmes ternaires (protéine/polysaccharide/eau) peut être réalisée à l'aide de méthodes d'analyse complémentaires. Voici une description du principe de l'électrophorèse capillaire, de la calorimétrie différentielle par titrage isothermique et de la diffusion statique de la lumière aux petits angles. Ces méthodes de caractérisation sont à la base des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse.

1.6.1 Électrophorèse capillaire

1.6.1.1 Principe de base

Principe de base

L'électrophorèse permet la séparation de molécules ou particules chargées. La séparation des molécules s'effectue en appliquant un champ électrique à travers un fluide conducteur contenant les substances à séparer. La vitesse de migration, appelée mobilité électrophorétique, dépend de la nature, de la charge ainsi que du ratio charge/masse des molécules (Figure 1.8). L'application de l'électrophorèse capillaire à l'étude des complexes est possible lorsque les charges nettes portées par la protéine, le polysaccharide et le complexe ont des valeurs suffisamment différentes.

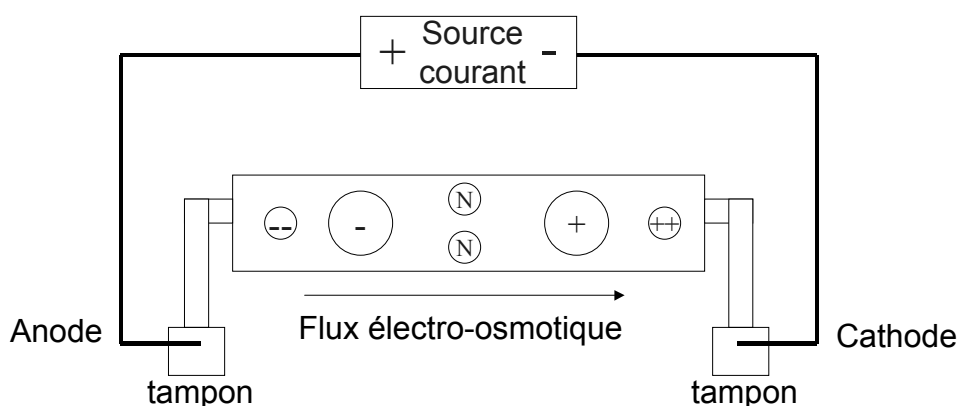


Figure 1.8 Principe de l'électrophorèse

Lors d'une analyse par électrophorèse capillaire, le réservoir d'introduction, le capillaire ainsi que le réservoir de récupération sont d'abord remplis de tampon (Figure 1.9). L'introduction de l'échantillon dans le système est ensuite effectuée en plaçant l'entrée du capillaire dans le vial de l'échantillon et en appliquant une pression ou un courant électrique pendant quelques secondes. Le capillaire est ensuite replacé dans le réservoir d'introduction avant d'appliquer le courant électrique, lequel induit la migration de l'échantillon dans le capillaire. Le mouvement du tampon contenu dans le capillaire est appelé flux électro-osmotique. Les solutés migrant à différentes vitesses dans le capillaire sont détectés par un détecteur, lequel envoie le signal à l'ordinateur. Les données traitées sont présentées sous la forme d'un électrophérogramme où les différents pics représentent les composés séparés à des temps de migration différents; le temps 0 correspondant au moment où le courant électrique est appliqué.

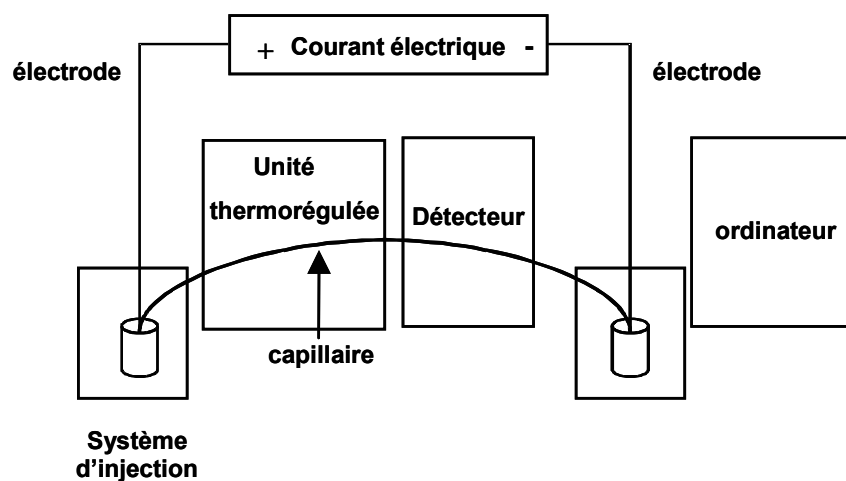


Figure 1.9 Ensemble des composants d'un appareil d'électrophorèse capillaire

L'introduction de l'échantillon

L'introduction de l'échantillon dans le capillaire peut s'effectuer d'une manière hydrodynamique ou par électromigration. Lors d'une introduction hydrodynamique, le contenant de tampon est d'abord remplacé par le contenant de l'échantillon. L'échantillon est ensuite introduit dans le capillaire soit par l'application d'une pression dans le contenant

d'échantillon, soit par la création d'un vide dans le contenant de réception ou soit par gravité lorsque le contenant de l'échantillon est plus haut que le contenant de réception. Le principal avantage de cette technique est que la concentration des molécules dans le capillaire est représentative de l'échantillon analysé.

Lors d'une introduction par électromigration, le contenant de tampon est remplacé par le contenant de l'échantillon. Ensuite, une tension, un courant ou une puissance électrique est appliqué pendant un temps donné, entraînant l'introduction de l'échantillon dans le capillaire. La concentration des molécules dans le capillaire dépend de leur mobilité électrophorétique. Les solutés introduits dans le capillaire ne sont donc pas toujours représentatifs de l'échantillon de départ. Cette technique est principalement utilisée lorsque l'introduction hydrodynamique ne peut être appliquée en raison de la présence d'un gel ou d'une substance visqueuse sur la paroi interne du capillaire.

Le capillaire

Les capillaires peuvent être composés de différents matériaux tels le Pyrex, le Téflon ou la silice fondue. La silice fondue est généralement préférée au Téflon pour sa flexibilité et sa conductivité thermique supérieure permettant une meilleure dissipation de la chaleur.

Les techniques de détection

Les systèmes de détection employés sur le capillaire sont issues des technologies développées en chromatographie liquide à haute performance. Les détecteurs les plus utilisés en électrophorèse capillaire sont ceux utilisant les propriétés spécifiques des molécules comme l'absorption dans l'ultraviolet, la fluorescence, la spectrométrie de masse, l'électrochimie, la radiométrie et la spectroscopie Raman. Le système de détection le plus simple et le plus utilisé en électrophorèse capillaire est l'absorption en ultraviolet. La limite de détection de l'absorption en ultraviolet, située entre 10^{-13} et 10^{-15} M, est généralement plus élevée que celle des autres détecteurs de propriétés spécifiques.

1.6.1.2 Analyse frontale continue

Principe de base

L'analyse frontale continue, d'abord utilisée en chromatographie par exclusion moléculaire, a été adaptée à l'électrophorèse capillaire. Gao et al. (1997, 1998) ont développé l'analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE) dans le but d'étudier les interactions entre les protéines et les polyélectrolytes synthétiques à différentes conditions. L'analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE) permet d'étudier les systèmes ayant des cinétiques de réaction lentes puisque l'équilibre à l'intérieur d'un échantillon est atteint dans le vial d'analyse préalablement à l'introduction dans le capillaire. La FACCE implique l'introduction de l'échantillon par électromigration tout au long de l'analyse. L'apparition de plateaux au lieu de pics sur l'électrophérogramme est une conséquence de cette injection continue. Généralement, un mélange ternaire soumis à une polarité normale produira de un à trois plateaux dont les hauteurs s'additionnent. L'introduction et la migration du complexe et du polysaccharide dépendent de leur charge. La quantification par mesure des hauteurs de plateaux est facilitée lorsque le polysaccharide n'absorbe pas à la longueur d'onde de détection sélectionnée. Lorsque la polarité dans le capillaire est normale, le premier plateau représente la protéine non liée, qui porte une charge positive, et le plateau suivant représente la protéine complexée (Figure 1.10).

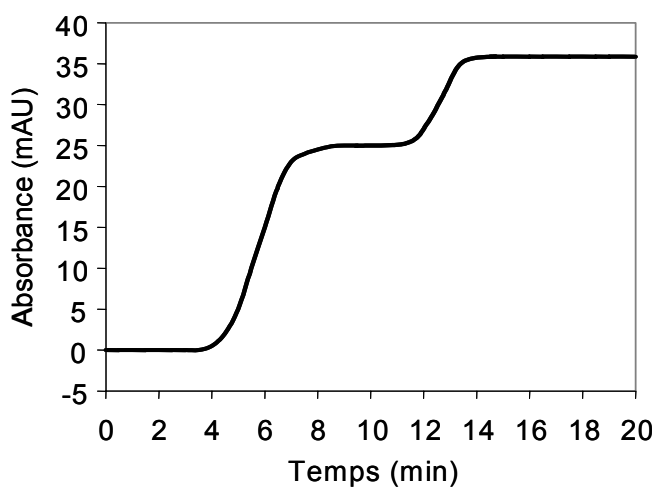


Figure 1.10 Électrophérogramme d'un mélange ternaire analysé par FACCE.

Cette technique, couplée à l'utilisation du modèle des sites de liaison superposés (overlapping binding site model) proposé par McGhee et von Hippel (1974) permet de calculer la stœchiométrie, la constante d'association, la coopérativité et la taille du site de liaison à partir des isothermes d'interactions.

Analyse des résultats par le modèle des sites de liaison superposés

Étant donné la grande taille du ligand (protéine) relativement à la macromolécule (polysaccharide) et la nature non spécifique de la complexation, le modèle mathématique considéré doit tenir compte de la possibilité de recouvrement des sites de liaison afin d'éviter une surestimation du nombre des sites de liaison potentiels (Figure 1.11).

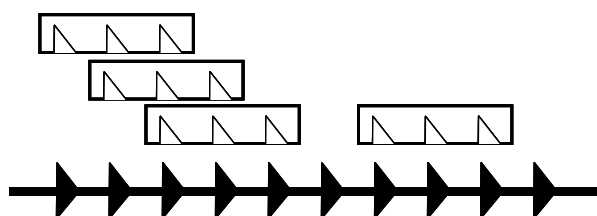


Figure 1.11 Modèle des sites de liaison superposés (McGhee et von Hippel, 1974)

Ce modèle, adapté du « Scatchard plot » (Scatchard, 1949), a été mis au point en vue de mieux illustrer l'interaction entre une molécule d'acide nucléique et une protéine (McGhee et von Hippel, 1974). La résolution de l'équation 17 par itération permet de calculer la constante d'association K (M^{-1}), la taille du site de liaison n (nombre de résidus D-galA couverts par une molécule de β -lg) et le paramètre de coopérativité ω . Le paramètre de coopérativité mesure le degré d'interaction entre les molécules de β -lg en présence de pectine. Il est positif lorsque cette interaction est attractive, négatif lorsque l'interaction est répulsive et nul lorsque aucune interaction n'est observée.

$$(17) \quad \frac{v}{L} = K(1-nv) \times \left(\frac{(2\omega-1)(1-nv)+v-R}{2(\omega-1)(1-nv)} \right)^{n-1} \times \left(\frac{1-(n+1)v+R}{2(1-nv)} \right)^2, \quad R = \sqrt{(1-(n+1)v)^2 + 4\omega v(1-nv)}$$

Où v : densité de l'interaction (molécules de β -lg liées/D-galA)
 L : concentration en ligand libre (M)

Les concentrations en β -lg libre sont directement obtenues des résultats en électrophorèse capillaire. Ces valeurs sont utilisées pour tracer les isothermes d'interaction des mélanges de β -lg/pectine qui sont des représentations de la densité de l'interaction (v) en fonction de la concentration en ligand libre (L). Le paramètre v est obtenu en divisant la quantité de molécules de β -lg complexées par le nombre de résidus D-galA présents dans le mélange. Le nombre de D-galA par molécule de pectine est calculé d'après leur poids moléculaire et en sachant qu'une molécule de pectine était constituée à 80% de résidus D-galA. La constante d'association, le paramètre de coopérativité et la taille du site de liaison sur la pectine sont finalement déterminés par itération statistique à l'aide du logiciel JMPIN (SAS Institute Inc., États-Unis).

1.6.2 Titration calorimétrique isothermique

La titration calorimétrique isothermique (ITC) est une technique permettant l'étude d'interactions de toutes sortes. Elle se base sur le fait que toute interaction libère ou absorbe une certaine quantité d'énergie. L'utilisation de cette technique couplée à un logiciel adéquat permet de calculer, entre autres, la constante d'association, la stoechiométrie, l'enthalpie et l'entropie de mélange d'un échantillon. Cette technique récente est encore peu utilisée pour l'étude de systèmes protéine/polysaccharide.

La différence d'énergie mesurée par cette technique est la somme des contributions provenant des interactions, de l'ionisation des molécules, des changements conformationnels et de l'agrégation (O'Brien et al., 2001). La préparation de l'échantillon doit limiter les contributions enthalpiques autres que celles provenant de l'interaction à l'étude. Les artefacts provenant de différences de pH et de force ionique peuvent être évités en dialysant les molécules dans un même tampon. Ce tampon doit être conservé pour la dilution des échantillon et pour remplir la cellule de référence. L'équilibre de la force ionique et du pH devient crucial dans le cas présent où la structure de la β -lg est fortement influencée par ces conditions.

L'enceinte d'un appareil ITC renferme une cellule de référence et une cellule d'analyse (Figure 1.12).

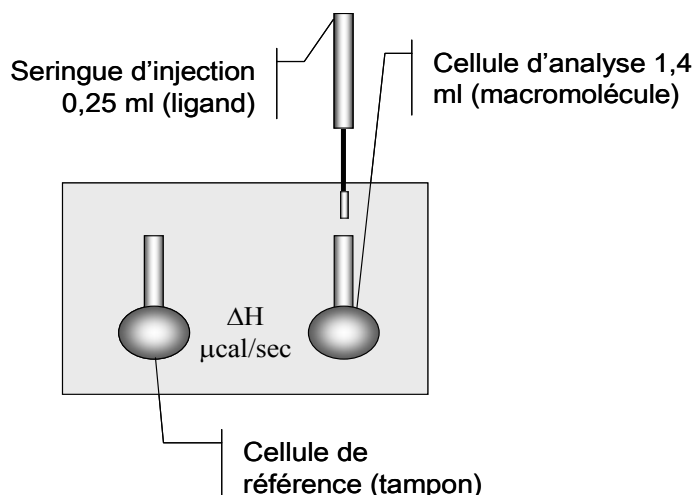


Figure 1.12 Schéma d'un appareil ITC

La cellule de référence contient le tampon de dialyse et la cellule d'analyse contient habituellement la macromolécule à l'étude. Après avoir équilibré le système à la température de l'étude, le ligand est injecté dans la cellule d'analyse par petites injections successives. La seringue d'injection est munie d'une pale qui permet une agitation dans la cellule d'analyse. L'agitation sera plus ou moins rapide selon la viscosité et la concentration des solutions. Une agitation trop rapide entraîne une distorsion de la ligne de base.

A chaque injection, la différence d'énergie enregistrée par rapport à la cellule de référence est rapportée sur un thermogramme (Figure 1.13). La surface de chacun des pics est intégrée et portée sur le graphique de l'enthalpie en fonction du ratio molaire dans la cellule.

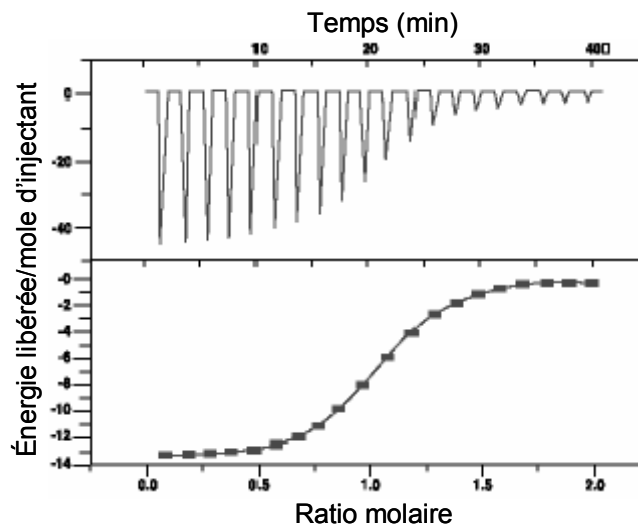


Figure 1.13 Exemple d'un thermogramme (haut) et d'un isotherm d'interaction (bas)

L'ensemble des points obtenus est appelé « isotherme d'interaction ». L'ajustement de la meilleure courbe permet à un logiciel de calculer en une seule analyse la constante d'association, la stœchiométrie, l'enthalpie, l'entropie et l'énergie libre d'un système. Bien que le logiciel intègre automatiquement les aires d'injection, il est préférable d'ajuster manuellement la ligne de base et l'intégration pour une meilleure précision. L'énergie de dilution est évaluée en effectuant deux types de blancs consistant à titrer le tampon avec le ligand et à titrer la macromolécule avec le tampon. Lorsqu'ils sont significatifs, les isothermes des blancs doivent être soustraits des isothermes des échantillons. L'énergie de dilution peut être évaluée par les dernières injections effectuées lors d'une analyse.

Les concentrations en macromolécule et en ligand, le volume et le nombre d'injections et le temps de repos entre chaque injection sont les paramètres expérimentaux ayant le plus d'impact sur la qualité des résultats. Ces paramètres doivent être ajustés de manière à avoir une interaction libérant suffisamment d'énergie tout en étant dans une zone permettant l'application de modèles mathématiques.

L'étendue de cette zone de validité est déterminée par la valeur sans unité « c » (Wiseman et al., 1989). La valeur c est calculée par l'équation 18.

$$(18) \quad c = K \times M_{\text{tot}} \times N$$

Où K : constante d'association (M^{-1})
 N : paramètre stoechiométrique de l'interaction
 M_{tot} : concentration de la macromolécule dans la cellule d'analyse (M)

Plus la valeur c est grande, plus la courbe de l'isotherme aura une amplitude qui se rapproche du ΔH de la réaction (Figure 1.14).

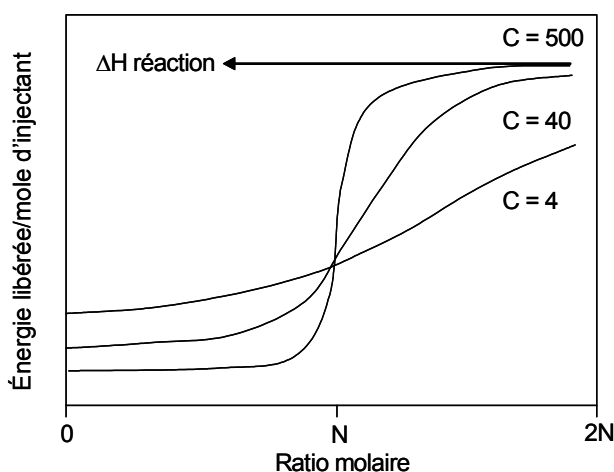


Figure 1.14 Isothermes d'interactions en fonction de la valeur c.

La valeur de c doit être située entre 1 et 1000 et de préférence entre 10 et 100. Lorsque la valeur c est supérieure à 10, la concentration finale du ligand dans la cellule doit être environ 1,5 fois celle de la macromolécule. Lorsque la valeur c est inférieure à 10, la concentration finale dans la cellule doit être de 2 à 2,5 fois celle de la macromolécule. Lorsque la constante d'association et la stoechiométrie d'un système sont inconnues, la concentration en macromolécule est choisie de manière à ce qu'une chaleur minimale de 3 à 5 μcal soit dégagée lors de l'injection. La concentration en ligand dans la seringue est généralement de 7 à 20 fois celle de la macromolécule dans la cellule. L'énergie libérée ou absorbée en fin d'analyse doit être nulle ou du moins tendre vers zéro indiquant la

saturation de la macromolécule. Un isotherme d'interaction doit avoir un minimum de 10 injections dont le volume doit permettre une libération d'énergie suffisante. La présence d'un plateau isothermique en début d'analyse facilite l'ajustement de la meilleure courbe. Il indique que la totalité des molécules de ligand injectées sont liées (Figure 1.14).

Le temps laissé entre chaque injection doit permettre d'atteindre l'équilibre thermodynamique dans le système. Cet équilibre est atteint lorsque la courbe revient à la ligne de base correspondant à une énergie libérée nulle (O'Brien et al., 2001). La quantité de ligand injectée, la viscosité du mélange, l'agitation et la spontanéité de la réaction sont des facteurs influençant la rapidité de l'équilibre.

1.6.3 Diffusion statique de la lumière aux petits angles

La diffusion statique de la lumière aux petits angles est une technique couramment utilisée pour l'étude de la séparation de phases de systèmes colloïdaux (Rouw et al., 1989; Mallamace et al., 1996; van Bruggen et al., 1999). Le traitement des données brutes obtenues par cette technique permet aussi de déterminer la distribution de taille des particules à l'étude.

Un faisceau lumineux est dévié lorsqu'il arrive à l'interface de deux matériaux d'indices de réfraction différents. Cette déviation de la lumière est appelée diffusion alors qu'une perte d'intensité lumineuse est reliée à l'absorption. L'angle et l'intensité de lumière diffusée varient avec la taille des particules rencontrées. L'angle de diffusion de la lumière est inversement proportionnel au diamètre de la particule (Figure 1.15).

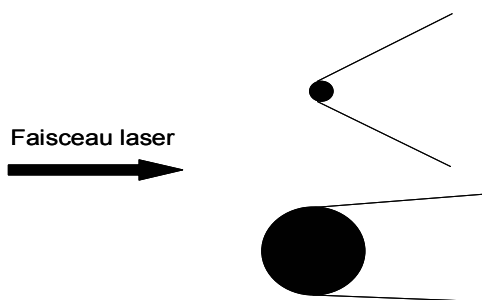


Figure 1.15 Angle de diffusion de la lumière en fonction de la taille des particules

La diffusion de la lumière est mesurée à l'aide d'un appareil constitué d'une source de lumière, d'un dilatateur de faisceau, d'une cellule contenant l'échantillon, d'une lentille à transformation de Fourier et d'un système de détection (Figure 1.16).

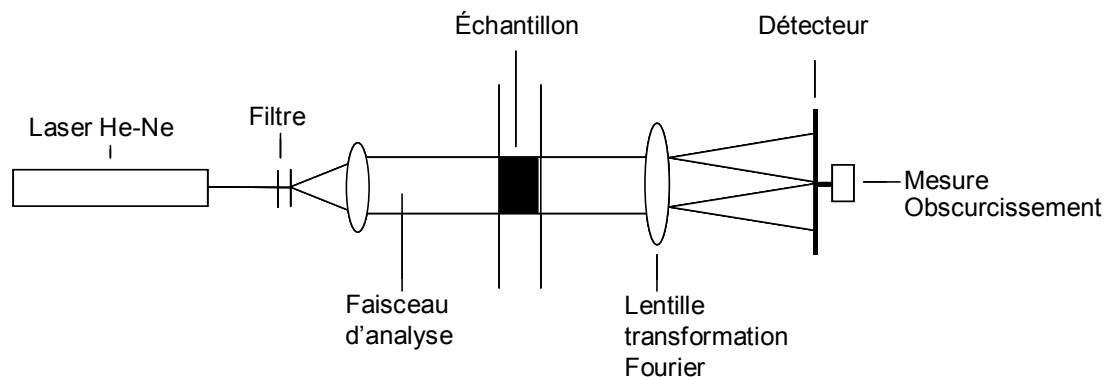


Figure 1.16 Schéma d'un appareil de diffusion statique de la lumière aux petits angles.

La lumière monochromatique d'un faisceau laser améliore la résolution lors de l'analyse de mélanges de particules de différentes tailles. Le faisceau laser est filtré et collimaté (ondes lumineuses parallèles) à l'aide de deux lentilles. La dilatation du laser permet l'analyse d'une plus grande quantité d'échantillon. Les particules d'un échantillon en solution sont exposées au faisceau laser à travers une cellule d'analyse. Une lentille à transformation de Fourier est placée entre l'échantillon et le détecteur. La taille de la lentille détermine l'étendue des angles de détection couverts. Le patron de diffusion d'une particule de taille spécifique est envoyé aux mêmes détecteurs indépendamment de sa position dans le faisceau.

L'analyse de particules de très petites tailles nécessite l'emploi d'une lentille adoptant une configuration de Fourier inverse. Cette configuration permet de mesurer la diffusion de la lumière à des angles beaucoup plus grands que la configuration conventionnelle. Cette configuration optique implique une inversion de l'ordre des composantes. Le faisceau laser dilaté n'est plus collimaté (ondes parallèles) et converge en un point du plan du détecteur. La cellule d'analyse est placée entre la lentille et le détecteur à une distance précise du plan du détecteur. La distance de la cellule au détecteur de la configuration inverse de Fourier correspond à la longueur focale du système optique conventionnel.

La lumière diffusée est détectée par un ensemble de détecteurs à différents angles. L'acquisition d'une donnée nécessite la prise de mesures réalisées en des temps très courts. Un logiciel permet de transformer les patrons de lumière diffusée en diamètres volumiques moyens. La fidélité des valeurs mesurées par rapport aux valeurs prédites est évaluée par l'erreur de la méthode des moindres carrés exprimée par le résidu.

Lorsque les particules sont sphériques et de petite taille, l'intensité de la lumière diffusée, $I(q)$, en fonction du vecteur d'onde, q , peut être utilisée pour caractériser la séparation de phases d'un mélange. Le vecteur d'onde q est défini par l'équation 19.

$$(19) \quad q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Où n : indice de réfraction de la phase continue
 λ_0 : longueur d'onde de la lumière incidente dans le vide
 θ : angle de détection de la lumière diffusée

Une séparation de phases entraîne l'apparition de fluctuations locales de concentrations entraînant une modification du patron de diffusion de la lumière. Les mécanismes de séparation de phases de décomposition spinodale et de nucléation et croissance peuvent parfois être différenciés par la diffusion de la lumière.

Lors d'une décomposition spinodale, un maximum d'intensité de lumière diffusée (I_{\max}) est observé à un vecteur d'onde caractéristique (q_{\max}). Lors des étapes initiales de la décomposition spinodale, I_{\max} croît exponentiellement à une valeur constante de q_{\max} . La taille des domaines structuraux (Λ) développés dans les phases initiales peut être évaluées par la relation $\Lambda=2\pi/q_{\max}$. Lors des étapes intermédiaires, le déplacement de q_{\max} vers des valeurs de q inférieures indique une augmentation de la taille des domaines structuraux. Cette augmentation est due à une coalescence des domaines structuraux (Sanchez et al., 2002). Lors des étapes tardives, q_{\max} et I_{\max} atteignent des valeurs constantes démontrant une stabilisation du système. La décomposition spinodale est caractérisée par l'obtention d'une seule courbe lorsque les valeurs normalisées I/I_{\max} sont reportées en fonction des valeurs normalisées q/q_{\max} (Furukawa, 1984).

Une décroissance monotone de l'intensité lumineuse diffusée en fonction du vecteur d'onde est la signature d'un phénomène de nucléation et croissance (Sanchez et al., 2002). La présence d'une valeur q_{\max} peut parfois être observée lorsqu'une couche de déplétion est formée autour des particules de la phase diluée ou à concentration élevée où un grand nombre de particules sont entassées dans un volume limité (Eliçabe et al., 1997, 1998). Dans ces cas-ci, q_{\max} se déplace vers des valeurs de q plus petites ou plus grandes selon l'évolution de la taille des particules du système.

Lorsqu'en coordonnées bi-logarithmiques, $I(q)$ diminue linéairement aux valeurs élevées de q sur plus d'une décade, l'agrégation des particules est fractale. La pente en valeur absolue de cette section linéaire correspond à la dimension fractale des agrégats (Teixeira, 1988; Kim et Berg, 2000). Un objet fractal est caractérisé par la répétition d'une même structure de base retrouvée à toute échelle d'observation.

1.7 HYPOTHÈSE, BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

1.7.1 Hypothèse

Les travaux ayant porté sur les interactions protéine/polysaccharide ont permis une compréhension partielle des systèmes ternaires. Généralement, les conditions régissant la formation de complexes protéine/polysaccharide ont été étudiées en omettant une approche fondamentale sur la nature des interactions impliquées en fonction du pH et de la force ionique. L'utilisation de la β -lactoglobuline dans ce domaine de recherche est intéressante puisque cette protéine est bien caractérisée et très utilisée comme ingrédient alimentaire pour ses bonnes valeurs nutritionnelle et fonctionnelle. Le choix de la pectine se justifie par une utilisation répandue en industrie alimentaire, un caractère anionique ainsi que par l'intérêt général porté au rôle de fibre alimentaire des polysaccharides naturels.

Ainsi, l'étude du modèle β -lg/pectine hautement ou faiblement méthylée en zone de compatibilité thermodynamique, à l'aide de techniques analytiques complémentaires, permettra de mieux comprendre les interactions protéine/polysaccharide anionique impliquées lors de la complexation à différentes conditions de pH, de force ionique et de concentrations.

1.7.2 But

Le but de cette étude était d'acquérir des connaissances fondamentales sur les interactions entre les protéines et les polysaccharides anioniques. Ces nouvelles connaissances seront utiles à l'amélioration de procédés de fabrication des complexes en tant qu'ingrédient alimentaire.

1.7.3 Objectifs spécifiques

1. Étudier les conditions de formation des complexes β -lg/pectine ainsi que la nature des interactions impliquées en fonction du pH, du ratio et du DE de la pectine par des

techniques de titrage potentiométrique et d'ultrafiltration en conditions déstabilisantes (NaCl, urée, température) (Chapitre 2).

2. Déterminer les paramètres d'interactions tels la constante d'association, les sites d'interaction et la stoechiométrie des complexes β -lg/pectine en fonction du pH, du ratio et du DE de la pectine par électrophorèse capillaire et par l'ultrafiltration de complexes peptides de la β -lg/pectine (Chapitre 3).
3. Déterminer les paramètres thermodynamiques tels l'enthalpie, l'entropie, l'énergie libre de Gibbs, la stoechiométrie et la constante d'association lors de la formation des complexes β -lg/pectine en fonction du degré d'estérification de la pectine par une technique de titrage isothermique calorimétrique (Chapitre 4)
4. Étudier l'évolution de la structure des complexes β -lg/pectine et la cinétique de séparation de phases lors de la formation des complexes β -lg/pectine en fonction du pH, du ratio et du degré d'estérification de la pectine par une technique de diffusion statique de la lumière aux petits angles (Chapitre 5).

Les dispositifs expérimentaux mis en œuvre pour l'atteinte de ces quatre objectifs sont présentés aux chapitres 2 à 5, respectivement.

CHAPITRE 2: Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- or high-methoxyl pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration

Maude Girard, Sylvie L. Turgeon & Sylvie F. Gauthier

Centre de recherche en sciences et technologie du lait STELA

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation

Université Laval

Québec, Qc, G1K 7P4, Canada

Publié dans *Food Hydrocolloids*, **2002**, *16*, 585-591.

2.1 RÉSUMÉ

Les pH de formation des complexes solubles (pH_c) entre la β -lactoglobuline (β -lg) et la pectine faiblement ou hautement méthylée (pectine LM ou HM) ont été déterminés par titrage potentiométrique. La nature des interactions a été étudiée par des conditions déstabilisantes telles l'emploi de chlorure de sodium ou d'urée et l'entreposage à différentes températures. Le degré de complexation a été mesuré par l'ultrafiltration des solutions β -lg/pectine LM ou HM à des pH entre 4,5 et 7,0. La quantité de β -lg complexée dosée est supérieure avec la pectine LM comparativement à la pectine HM. Environ 96 et 78% des molécules de β -lg sont complexées à pH 4,5 et à un ratio protéine/polysaccharide de 4:1 (p/p) avec la pectine LM et la pectine HM, respectivement. L'effet déstabilisant du chlorure de sodium, de l'urée et d'une augmentation de température ont démontré que les interactions maintenant les complexes β -lg/pectine LM ou HM sont majoritairement de nature électrostatique et proviennent en partie de liens hydrogène.

2.2 ABSTRACT

The pH values leading to the formation of soluble complexes (pH_c) between β -lactoglobulin (β -lg) and low- or high-methoxyl pectin (LM- or HM-pectin) were determined using potentiometric titrations. The nature of interactions was determined by using sodium chloride, urea and different temperatures. The extent of complex formation was quantified by ultrafiltration of β -lg/LM- and β -lg/HM-pectin solutions, at pH values between 4.5 and 7.0. The amount of β -lg complexed was greater with LM- than with HM-pectin. At pH 4.5 in deionized water and at a protein/polysaccharide 4:1 (w/w) ratio, about 96% of the β -lg complexed with LM-pectin, whereas only 78% complexed with HM-pectin. The destabilizing effect of sodium chloride, urea and temperature has demonstrated that interactions in the systems are mainly caused by electrostatic forces and, to a lesser extent, hydrogen bonding.

2.3 INTRODUCTION

The thermodynamic compatibility between proteins and polysaccharides arises when attractive interactions are greater than repulsive forces. Repulsive interactions are always non-specific. They are mainly due to excluded volume effect and electrostatic interactions. These weak interactions exist when pH is higher than the isoelectric pH (IEP) of the protein. Attractive interactions can be specific, as in covalent linkages, or non-specific as in electrostatic interactions, van der Waals forces, hydrophobic interactions and hydrogen bonding (Schmitt et al., 1998). These interactions can lead to complex formation between proteins and polysaccharides. Entropic factors, such as the structure and molecular weight of biopolymers, influence the complexes obtained. Other factors have enthalpic origin. Their magnitude depends on the protein/polysaccharide ratio and on the nature and density of charges on the biopolymers. The pH and ionic strength are parameters that essentially influence electrostatic interactions (Burgess, 1990; van Oss, 1993; Xia and Dubin, 1994).

In this study the type of interactions between β -lactoglobulin (β -lg) and high- or low-methoxyl pectin (HM- or LM-pectin) were determined. β -lg was chosen because of its well-known structure (Sawyer et al., 1999). It has a molecular weight of 18,350 Da and possesses a hydrophobic core. The structure of this globular protein is stabilized by 2 disulphide bridges (McKenzie et al., 1972). The quaternary structure of β -lg is affected by pH, mineral content and temperature. At milk pH and room temperature, the protein adopts the dimeric form. Decreasing sodium chloride concentrations or increasing the temperature will lead to the monomeric form (Aymard et al., 1996; Renard et al., 1998). At pH below 3 or above 8, the dimers dissociate into monomers (Ragona et al., 1997).

Pectin was chosen since this polysaccharide is widely used in food products. It is an anionic biopolymer, which is essentially made up of D-galA residues. Pectins are classified by their degree of esterification (DE). Pectin is said to be high-methoxyl when the percentage of the esterified carboxyl groups is higher than 50%. Pectin is low-methoxyl, however, when the DE value is lower than 50% (Voragen et al., 1995).

Many studies have been carried out on interactions between proteins and polysaccharides (Serov et al., 1985; Gurov et al., 1988; Tolstoguzov, 1991). Subjects studied were mainly emulsifying or gelling properties of these systems (Tolstoguzov, 1986; Gurov and Nuss, 1986; Gurov et al., 1986; Tokaev et al., 1987; Tolstoguzov, 1991). Few works have identified the nature of the interactions between these biopolymers in diluted systems (Imeson et al., 1977; Xia and Dubin, 1993; Phillips and Williams, 1995; Tolstoguzov, 1997; Antonov and Soshinsky, 2000). Most studies on β -lg/pectin were on gelled or concentrated systems (Ndi et al., 1996a; Beaulieu et al., 2001) and the nature of the interactions involved was often only speculated on (Einhorn-Stoll et al., 1996; Zaleska et al., 2000; Wang and Qvist, 2000). The aim of this work was to investigate the nature of the interactions involved between the β -lg and LM- or HM-pectin. Potentiometric titrations and ultrafiltration were techniques chosen to determine complex formation conditions and the amount of β -lg complexed to pectin under different conditions, respectively. Sodium chloride and pH were used to establish the role of electrostatic interactions, while urea and temperature were used to verify hydrogen bonding and hydrophobic interactions respectively.

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Materials

Bovine β -lg AB (3X crystallized) was purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, On, Canada) as 95% pure protein and used without further purification. Low-methoxyl pectin (DE 28.3%, 94.3 kDa) and high-methoxyl pectin (DE 73.4%, 118 kDa) were donated by Hercules Copenhagen A/S (Copenhagen, Denmark). All reagents were of analytical grade and used as received.

2.4.2 Potentiometric Titrations

Complexation of protein with polysaccharide can be observed by potentiometric titration of the protein acidic and basic groups (Wen and Dubin, 1997; Mattison et al., 1998). Solutions of β -lg, LM- and HM-pectin were made in deionized water and stored overnight at 4°C to allow complete hydration of molecules. LM- or HM-pectin solution was added to β -lg solution to obtain β -lg:pectin weight ratios of 2:1; 4:1; 6:1; 8:1 and 10:1. The final solutions (60 mL) contained 0.05% (w/w) β -lg. Potentiometric titrations were performed at 22°C on the mixed β -lg-pectin solutions and on solutions of β -lg only (blank samples) with a Mettler-Toledo DL53 titrator (Schwerzenbach, Switzerland). The pH electrode was calibrated with pH 4.00 ± 0.01 , 7.00 ± 0.01 and 10.00 ± 0.01 buffers just before titrations. The initial pH was adjusted to 7.5 ± 0.05 with 0.01N NaOH and the solutions were titrated to reach pH 4.5. The observed pH was noted when the value was stable for at least 1 minute. The reproducibility of 2 repeated titrations was ± 0.05 pH units. The charge on β -lg relative to the isoelectric point of the protein (zero) was calculated with the equation 20 using the mass of β -lg in the solutions, the molecular weight of a β -lg monomer and the concentration of the titrant (Mattison et al., 1998).

$$(20) \quad \text{Relative charge on } \beta\text{-lg} = \frac{C \times D}{A/B}$$

Where A: β -lg titrated (g)
 B: β -lg molecular weight (g)
 C: Titrant concentration ($\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)
 D: volume of titrant (mL)

The pH initial of soluble complexes formation (pH_c) corresponds to the inflexion point on the titration curve. In order to evaluate the impact of electrostatic interactions and hydrogen bonds on the pH_c , the same solutions were prepared as described previously, but by respectively adding 110 mM sodium chloride and 110 mM urea to aqueous phases. The ionic nature of sodium chloride screens the electrostatic interactions. Urea is an uncharged molecule that reduces hydrogen bonding without modifying the ionic strength (West et al., 1997).

2.4.3 Quantification of the complexed β -lg

This method was adapted from Noiseux et al. (2001). The β -lg and pectin solutions were rehydrated with deionized water and stored overnight at 4°C. LM- or HM-pectin was added to β -lg solution in an Eppendorf® tube to obtain a protein/pectin weight ratio of 4:1. The volume of the mixtures was adjusted to 500 μL with deionized water. The final solutions contained 0.05% (w/w) β -lg and 0.0125% (w/w) pectin. The quantity of complexed β -lg to pectin was evaluated at pH 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0 and 4.5. As in the case of potentiometric study, the presence of electrostatic interactions and hydrogen bonding was evaluated at 22°C by adding 110 mM sodium chloride or 110 mM urea to solutions. To evaluate the significance of hydrophobic interactions, the solutions prepared in water only were also evaluated after holding overnight at 4 and 40°C.

The solutions, called total solutions, were shaken gently and 250 μL were ultrafiltrated by centrifugation through a Microcon® device YM-100 (100 kDa MWCO, Millipore, Bedford, MA) at 3,500 g for 30 minutes at the temperature under study. The membrane retained the LM- and HM-pectin and the protein/pectin complexes while the non-complexed proteins passed through the membrane. The proteins in total solutions and

those recovered in permeates were assayed by a bicinchoninic acid protein assay (BCA) (Smith et al., 1985). The regenerated cellulose membrane used is low protein binding, the amount of adsorbed protein on the membrane varies with the experimental conditions. To take into account this phenomenon, β -lg solutions (0.05%) without pectin were treated and filtered under the same conditions and the amount of β -lg in these ultrafiltration permeates was considered as the 100% reference. The amount of β -lg complexed with the pectin was determined with the equation 21.

$$(21) \quad CP = \frac{100 - UF}{UPF}$$

Where CP: complexed β -lg (%)
 UF: β -lg in ultrafiltration permeate
 UPF: β -lg in ultrafiltration permeate of pectin-free solution

The pH_c was determined by choosing the initial pH at which there was more than 10% of β -lg complexed to pectin to take into account the error of the method showed by the standard deviation bars on the figures. The molecular weight of the biopolymers, their concentration in the mixtures and the amounts of protein complexed on pectin allowed us to calculate the number of proteins and pectin molecules in the mixtures and the molecular ratio of the complex.

2.4.4 Statistical Analysis

Effects of temperature, pH, solvent and pectin DE on the protein/pectin complexes were analyzed as a 3 (temperature) X 6 (pH) X 3 (solvent) X 2 (pectin DE) factorial experiment by analysis of variance performed by SAS. All the experiments were completed in duplicate.

2.5 RESULTS AND DISCUSSION

2.5.1 Potentiometric Titrations

Generally, the titration curves on Figure 2.1 and Figure 2.2 show that the amount of hydrochloric acid needed to titrate β -lg was higher with the addition of LM and, to a lesser extent, HM-pectin. In fact, the pectin decreases the pK_a of β -lg ionic groups (Mattison et al., 1995; Wen and Dubin, 1997). As a result, the complex bears more negative charges than the protein alone at pH 7.5 (Table 2.1). The β -lg/LM-pectin ratio had no significant effect on the initial pH of soluble complexes formation (pH_c) that is 6.1 for the 10:1; 8:1; 6:1 4:1 and 2:1 ratios (Figure 2.1A). Mattison et al. (1995) have found that the pH_c of BSA/poly(dimethyldiallylammonium chloride) was independent of ratio. Therefore, the complex formation begins with 1 protein molecule binding to 1 chain of pectin (Mattison et al., 1995). There are two models used to describe the binding between proteins and anionic polysaccharide as a function of pH. The first arises at $pH < IEP$ of the protein. The binding is non-specific and is due to opposite net charges of the two biopolymers. The second occurs at $pH > IEP$ of the protein and is between chain segments of anionic polysaccharides and the positively charged region(s) on the polypeptide chains of protein (Imeson et al., 1977; Stainsby, 1980). Thus, the interaction between pectin and β -lg at $pH > IEP$ occurs via local positive patches on the protein (Park et al., 1992; Xia and Dubin, 1994; Mattison et al., 1998). In Figure 2.1A, the curves for the 8:1 and 10:1 ratios are almost superimposed. This means that at ratio 8:1, it takes 0.05% (w/w) β -lg in solution to saturate LM-pectin at 0.00625% (w/w). Figure 2.1B illustrates the titration curves of β -lg/HM-pectin systems. The pK_a value of the β -lg ionic groups was not decreased as much with HM-pectin as with LM-pectin. The pH_c , which is about 5.5, was not influenced by the β -lg/HM-pectin ratio. The difference between the pH_c values of complexes containing LM- or HM-pectin is due to the dependency of these values on the polysaccharide charge density (Park et al., 1992). The 4:1; 6:1; 8:1 and 10:1 ratios had similar curves indicating that the HM-pectin was saturated with β -lg at a 4:1 ratio. The charge of the β -lg with HM-pectin was comparable to the charge of protein alone (Table 2.1). This is explained by the lower content of carboxylic

groups in HM-pectin, which limits the possibility of electrostatic binding with β -lg. Thus, the HM-pectin becomes saturated with proteins faster than the LM-pectin. The LM-pectin holds more H^+ than β -lg/HM-pectin which shows that LM-pectin is more strongly complexed to β -lg than HM-pectin (Hattori et al., 2000).

To verify the nature of the interactions involved in the β -lg/LM- or HM-pectin complexes, titrations on a 4:1 ratio were performed in 110 mM sodium chloride (electrostatic interactions) and in 110 mM urea (hydrogen bonds). Results presented in Figure 2.2A show that titrations done on sodium and urea containing mixtures were only slightly modified from titrations on the protein alone. It is known that the pK_a value of a protein decreases with an increase in ionic strength (Wen and Dubin, 1997). Sodium chloride decreased pH_c from 6.1 to 5.5 for the β -lg/LM mixture. The significant destabilizing effect of sodium chloride shows the presence of electrostatic interactions. These interactions are known to be of greatest importance in a protein/polysaccharide system (Tolstoguzov, 1997). Electrostatic interactions result in the loss of polymer flexibility and mobility. However, the reaction is favored by the gain in enthalpy and entropy due to the release of counter ions and water molecules (Piculell et al., 1995; Tolstoguzov, 1997). The non-ionic nature of urea did not significantly influence the titrable groups of β -lg in mixture with pectin. The screening effect of sodium chloride on β -lg/HM complexes is illustrated by the superimposition of the β -lg and β -lg/HM-pectin curves (Figure 2.2B). The electrostatic interactions between β -lg and HM-pectin were not strong enough to compensate for the destabilizing effect of the sodium chloride. The inflexion points of the titration curves were not accurate enough to determine pH_c . The urea had no significant effect on the β -lg/LM titration curves. Although, it is hard to measure the effect on the β -lg/HM titration curves.

2.5.2 Ultrafiltration

Potentiometric titrations provided qualitative results on the complexation of β -lg with the LM- or HM-pectin. An ultrafiltration technique was used to quantify the amounts of complexes at different pH values. The types of interactions were determined by using 110

mM sodium chloride, 110 mM urea and different temperatures (4, 22, 40°C) to disrupt electrostatic interactions, hydrogen bonding, and hydrophobic interactions, respectively. Figure 2.3 illustrates the amount of β -lg complexed with LM- or HM-pectin at 22°C in solutions prepared with water, NaCl and urea. The negative values obtained were due to Donnan exclusion effect (Timmer et al., 1998). Pectin facilitated the passage of β -lg through the UF membrane due to similar net negative charges on both polymers at $\text{pH} > \text{IEP}$ of the protein. The pH_c of β -lg/LM-pectin was 6.0 in deionized water, 5.0 in sodium chloride and 6.0 in urea. Maximum amounts of protein were complexed with pectin molecules at pH 4.5, which is situated between the IEP of the protein and the pK_a of the pectin. At this pH, there were $96.2 \pm 3.7\%$, $86.4 \pm 10.1\%$ and $102.5 \pm 0.7\%$ of proteins that were complexed on the LM-pectin molecule in water, in sodium chloride and in urea, respectively. These percentages correspond to 18, 16 and 19 molecules of β -lg complexed with a LM-pectin molecule.

The pH_c of the β -lg/HM-pectin was 5.5 in water, 4.5 in sodium chloride and 4.5 in urea (Figure 2.3). At pH 4.5, the pH at which complex formation reached a maximum, there was $78.4 \pm 2.0\%$, $16.7 \pm 0.2\%$ and $41.4 \pm 8.8\%$ of proteins that complexed with HM-pectin in water, in sodium chloride and in urea, respectively. Thus, there were 20, 4 and 10 protein molecules complexed with each HM-pectin molecule in water, sodium chloride and urea, respectively. Laneuville et al. (2000) found that at pH 5.2, at 22°C and for a protein/xanthan gum ratio of 5:1 (w/w), 84% of β -lg was complexed with xanthan.

The pH_c obtained from the quantification of complexed β -lg in water by ultrafiltration are about the same as the values assessed by titration (Figure 2.2 and Figure 2.3). As observed with the potentiometric results, interactions between β -lg and LM-pectin were stronger than with HM-pectin. As mentioned earlier, the stronger anionic character of the LM-pectin promotes electrostatic interactions. It is proposed that negatively charged LM- and HM-pectin interact with β -lg via carboxylic, amino, imidazole and guanidine groups in the peptide chain of β -lg. As in titration potentiometry, the addition of sodium chloride to β -lg/LM- or HM-pectin mixtures showed the importance of electrostatic interactions by decreasing the pH_c value and the total amount of complexed β -lg with pectin. Enhanced

ionic strength reduced the H^+ holding capacity of β -lg/pectin complex, meaning that sodium chloride diminished the binding force between β -lg and the polysaccharides (Hattori et al., 2000). The electrostatic interaction between the carboxylic groups of the acacia gum and the α -helix of the β -lg was determined by circular dichroism (Schmitt et al., 2001). This part of the protein is composed of basic amino acids, which are able to participate in electrostatic interactions at acidic pH values. Electrostatic interactions are involved in many protein/polyelectrolyte systems (Ambjerg Pedersen and Jørgensen, 1991; Dickinson and Galazka, 1991; Yang et al., 1998; Galazka et al., 1999).

The amount of complexed proteins with LM- or HM-pectin decreased with urea, but the pH_c was lowered only for the complexes containing the HM-pectin. The influence of urea on β -lg/LM- or HM-pectin complexes indicates the importance of hydrogen bonding. The weakness of β -lg/HM-pectin complexes with urea is due to its larger amounts of ester groups involved in hydrogen bonding (Antonov et al., 1996). These interactions occur between the hydrogen on an oxygen, sulphur or nitrogen atom and an electronegative atom like the oxygen of the carbonyl group. Pectin can form hydrogen bonds with the hydroxyl, amide, phenyl and carboxylic groups of the β -lg.

Our results are consistent with those obtained in other studies that observed hydrogen bonding between biopolymers (Xia and Dubin, 1993). Zaleska et al. (2000) found that interactions between pectin and a whey protein isolate occurred between the carboxyl group of pectin and the peptidic bonds of the protein. Hydrogen bonding was observed between ester groups of gelatin and pectin. At $pH > IEP$ of gelatin, the interaction increased with the DE of pectin (Braudo and Antonov, 1993; Antonov et al., 1996). The hydrogen bonds were identified by a critical miscibility point at a low temperature (20°C). Some studies have shown the importance of hydrogen binding between casein- α_s and λ -carrageenan and between myofibrillar protein and alginate (Phillips and Williams, 1995; Ustunol et al., 1992). Circular dichroism allowed for the identification of hydrogen bonds between ribuloso-1,5-biophosphate alfalfa and pectin. These bonds involved hydroxyl groups of tyrosine, in which oxygen acts as a proton acceptor, and the amine group on the tryptophan residues (Antonov and Soshinsky, 2000).

As illustrated on Figure 2.4, the pH_c of the β -lg/LM-pectin complexes decreased from 6.5 at 4°C to 6.0 at 40°C. The amount of complexes obtained did not vary with temperature at pH 4.5. A rise in temperature lowered the pH_c of the β -lg/HM-pectin complexes from 5.5 at 4°C to below 4.5 at 40°C. Contrary to β -lg/LM-pectin complexes, the total amounts of proteins complexed with HM-pectin, observed at pH 4.5, decreased with temperature. The destabilizing effect of increasing temperature shows that hydrophobic interactions are not significant under the conditions studied. Hydrophobic interactions would have been possible between the β -lg amino acids containing aliphatic and aromatic side chains and esters groups of pectin. A heat treatment in the ranges of denaturation temperatures would have been necessary to expose hidden hydrophobic groups of β -lg. However, hydrogen bonding in the complexes has been confirmed by the stabilizing effect of low temperature. This type of interactions would be involved especially when the pH is higher than the IEP of the protein. At $pH < IEP$, the fact that urea had very little effect on the amount of β -lg/LM-pectin complexes formed is indicative of the greater role electrostatic interactions play in complex formation. The temperature increased the destabilizing effect of urea (results not shown) but did not have a significant effect on mixtures containing sodium chloride (results not shown). Hydrogen bonding is also substantiated by the greater destabilizing effect highest temperature has on β -lg/HM-pectin complexes. Our results are in disagreement with those obtained by Kaibara et al. (2000). They found that temperatures between 5 and 63°C did not influence the pH_c values in bovine serum albumin/poly(dimethyldiallylammonium chloride) system. Harding et al. (1993) found that complexes between bovine serum albumin (BSA) and alginate were formed at 25°C but not between 35 and 70°C. The authors concluded that conformational changes in the BSA in this temperature range prevented interactions with alginate.

2.6 CONCLUSION

The results indicated that electrostatic interactions were mainly involved in β -lg/LM and HM-pectin systems. Hydrogen bonding played a major role in the resulting interactions, especially in HM-pectin containing complexes. An increase in temperature

lowered the amount of complexed β -lg and confirmed the presence of hydrogen bonding. The carboxyl groups enabled the LM-pectin to complex more protein than HM-pectin. The error margin induced by the Donnan exclusion effect observed with ultrafiltration membranes is unknown. Therefore, the quantitative aspect of β -lg/pectin interactions was investigated with frontal analysis continuous capillary electrophoresis and presented in the chapter 3.

Table 2.1 Relative charge on β -lg/pectin complex at different ratios (w/w) β -lg/pectin at pH 5.0 and 7.5.

<i>β-lg/pectin ratio</i>	<i>pH 7.5</i>		<i>pH 5.0</i>	
	β -lg ^a /LM-pectin	β -lg ^a /HM-pectin	β -lg ^b /LM-pectin	β -lg ^b /HM-pectin
2:1	-12.9	-6.7	3.5	2.3
4:1	-10.8	-6.4	3.9	1.5
6:1	-8.9	-6.5	3.0	1.7
8:1	-8.6	-6.0	2.7	1.7
10:1	-8.4	-6.0	2.0	1.6

^aRelative charge on β -lg alone at pH 7.5: -6.1

^bRelative charge on β -lg alone at pH 5.0: 1.2

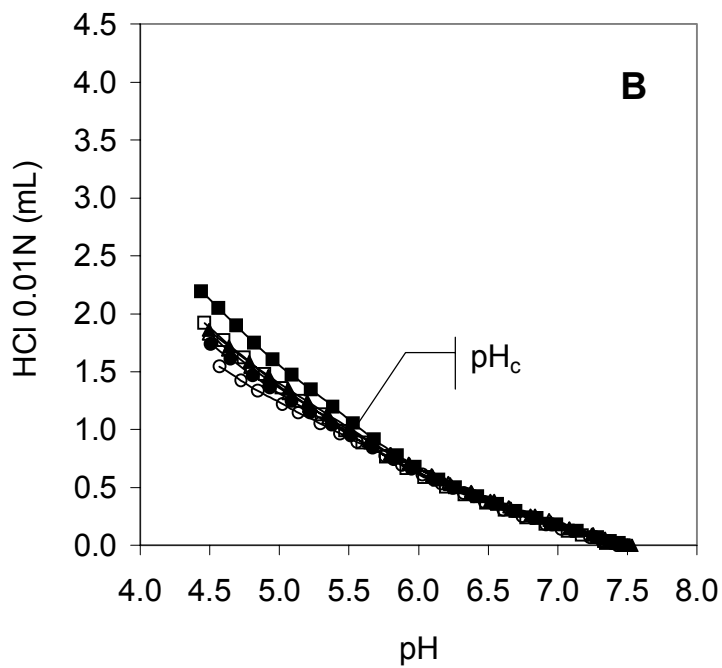
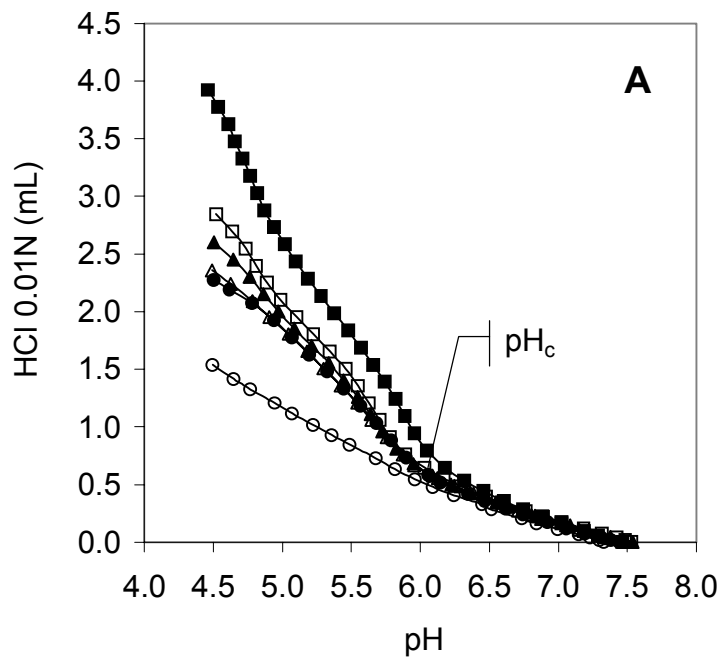


Figure 2.1 Titration curves of β -lg/pectin mixtures at different ratios (w/w) 2:1 (■), 4:1 (□), 6:1 (▲), 8:1 (△), 10:1 (●), β -lg 0.05% (○). A) β -lg/LM-pectin B) β -lg/HM-pectin.

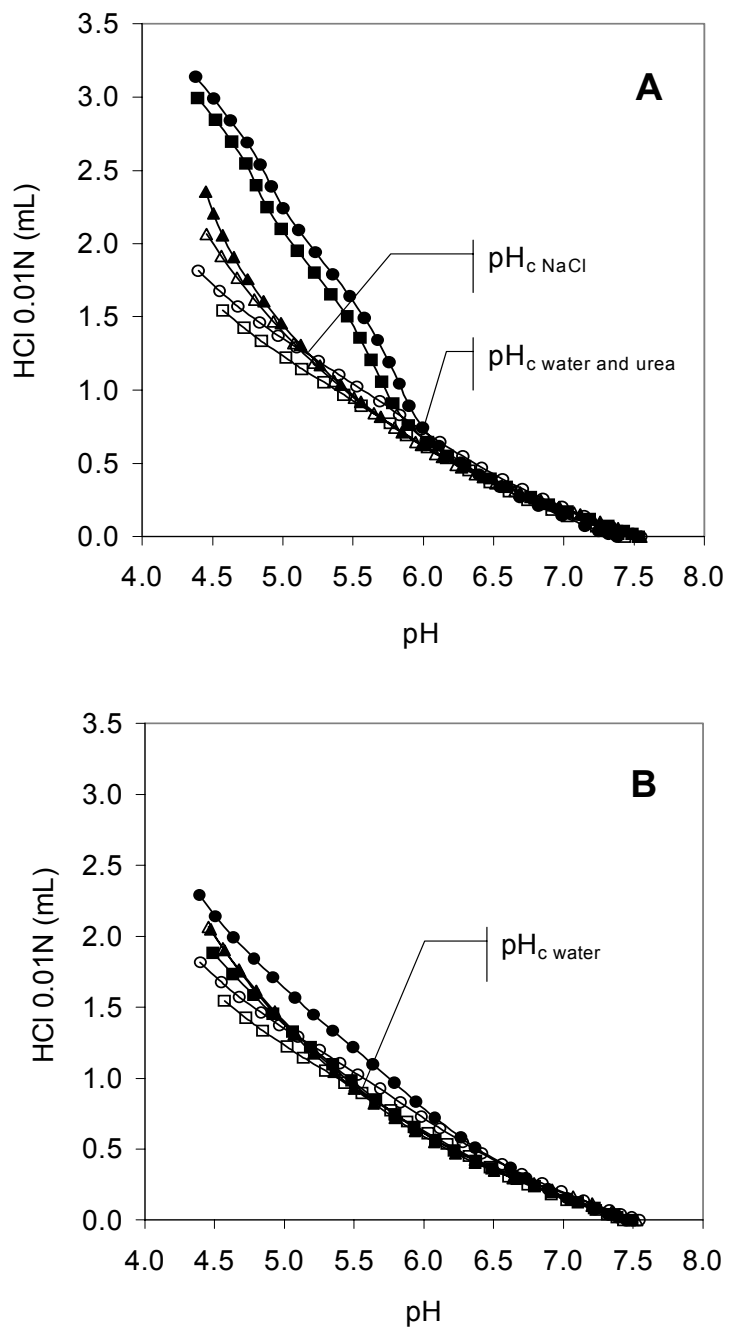


Figure 2.2 Titration curves of β -lg alone (dark symbols) and β -lg/pectin mixtures at 4:1 ratio (open symbols) in deionized water (\blacksquare), with 110 mM NaCl (\blacktriangle), and with 110 mM urea (\bullet) respectively. A) β -lg/LM-pectin B) β -lg/HM-pectin.

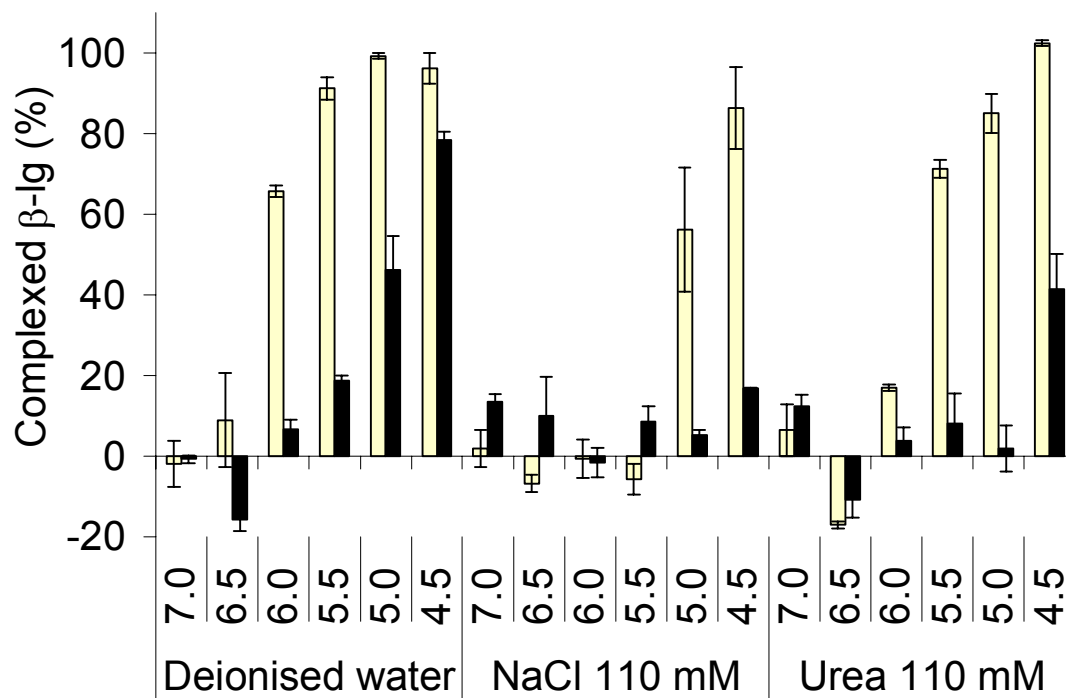


Figure 2.3 β -lg complexed with LM- (\square) and HM-pectin (\blacksquare) at 22°C, at 4:1 ratio and at different pH in deionized water, 110 mM NaCl or 110 mM urea.

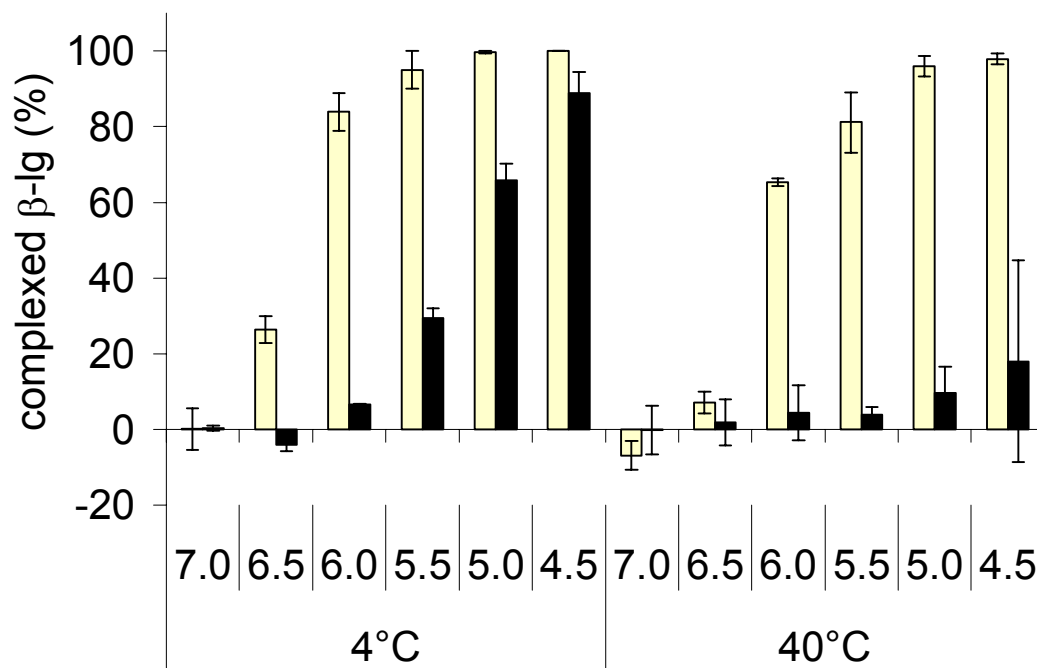


Figure 2.4 β -Ig complexed with LM- (□) and HM-pectin (■), at 4:1 ratio, in deionized water and at 4°C and 40°C.

CHAPITRE 3: Quantification of the interactions between β -lactoglobulin and pectin through capillary electrophoresis analysis

Maude Girard, Sylvie L. Turgeon & Sylvie F. Gauthier

Centre de recherche en sciences et technologie du lait STELA

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation

Université Laval

Québec, Qc, G1K 7P4, Canada

Sous presse *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51.

3.1 RÉSUMÉ

Les paramètres d'interaction des complexes β -lactoglobuline (β -lg)/pectine faiblement ou hautement méthylées (pectine LM ou HM) ont été déterminés par l'analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE), couplée au modèle mathématique des sites d'interaction superposés. À pH 4, environ 23 molécules de β -lg sont liées de manière coopérative sur la pectine LM. En se liant à la pectine LM, une molécule de β -lg couvre en moyenne un espace de 12 résidus D-galA. La constante d'association calculée dans ces conditions est de 1431 M^{-1} . Les zones de la β -lg potentiellement réactives avec la pectine ont été identifiées par une étude en ultrafiltration des interactions entre la pectine LM et quatre peptides localisés en surface de la β -lg. Le peptide β -lg 132-148, qui correspond à l'hélice α , et les peptides β -lg 76-83, 41-60 et 1-14 ont démontré une interaction attractive avec la pectine. Ces zones peptidiques seraient potentiellement impliquées lors de l'interaction de la β -lg avec la pectine.

3.2 ABSTRACT

Binding parameters of β -lactoglobulin (β -lg)/low- or high methoxyl pectin (LM- or HM-pectin) complexes were determined using frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE) and the overlapping binding site model. At pH 4, approximately 23 β -lg molecules are cooperatively complexed on LM-pectin, where each β -lg molecule covers an average of 12 D-galA residues. The calculated binding constant under these conditions is 1431 M^{-1} . The interactions between pectin and four selected peptides located on the outer surface of the β -lg were investigated using ultrafiltration in order to identify which part of the protein was likely to interact with the pectin. The peptide β -lg 132-148, which corresponds to the α -helix zone, and the peptides β -lg 76-83, 41-60, and 1-14 showed attractive interaction with the LM-pectin. Consequently, these peptides would potentially be involved in the interaction between β -lg and the pectin.

3.3 INTRODUCTION

The use of biopolymers such as polysaccharides and proteins is increasing in the pharmaceutical, cosmeceutical, nutraceutical and functional food industries. Interactions between proteins and synthetic polymers have been largely investigated (Gao et al., 1997, 1998; Wang and Dubin, 1998; Hallberg and Dubin, 1998; Azegami et al., 1999; Xia et al., 1999; Kaibara et al., 2000; Hattori et al., 2000). Biopolymer interactions have been applied in the development of intestinal patches for drug-controlled delivery (Zancong and Mitragotri, 2002) and in polymeric nanoparticles used as carriers and protectors in oral vaccines and gene therapy (Prokop et al., 2002).

β -lactoglobulin (β -lg) is the major protein of the bovine milk whey. This highly nutritive protein possesses all the essential amino acids. The ability of β -lg to bind hydrophobic ligand, such as vitamins or fatty acids, has been extensively studied. Crystallographic studies have shown that molecules such as retinol, retinoic acid, palmitate, and cholesterol were able to bind in the central hydrophobic calyx of the β -lg (Qin et al., 1998a; Wu et al., 1999; Sawyer and Kontopidis, 2000; Kontodipis et al., 2002). However, the biological function of β -lg is still unknown (Kontodipis et al., 2002). The β -lg is a small globular protein of 18,350 Da. The β -lg has a well-known structure (Sawyer et al., 1999) containing mainly β -sheets, some β -turns and one α -helix. The quaternary structure of β -lg is affected by pH conditions, mineral content, and temperature. The protein is monomeric at very acidic pH (i.e., below 3) and alkaline pH (i.e., above 8), dimeric at neutral pH and found in both states between pH 3 and 6 (Taulier and Chalikian, 2001). The presence of the octameric form around pH 4.5 is likely to be negligible (McKenzie and Sawyer, 1967; Taulier and Chalikian, 2001).

Pectin is a cell wall polysaccharide of plants generally extracted from apple pomace or citrus fruits. Pectin is a soluble fiber that reduces the risks of colon cancer (Nangia-Makker et al., 2002). This anionic polysaccharide is essentially made up of D-galA residues. Few studies have been carried out on the quantification of β -lactoglobulin/polysaccharide interactions. Measuring the binding parameters that

characterize protein/polysaccharide complexes is essential to accurately evaluate binding conditions. Biopolymer interactions can be difficult to quantify because of the heterogeneity of the natural material. Frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE) was developed to study interacting homogeneous molecular weight systems (Gao et al., 1997).

In this study, FACCE was used to separate the non-complexed (free) β -lg from the pectin and the β -lg/pectin complexes, to plot the binding isotherms, and to calculate the binding stoichiometry of the β -lg/pectin complexes. Results obtained with FACCE were treated with the overlapping binding site model (McGhee and von Hippel, 1974). This model was used to calculate the binding constant, the cooperativity parameter, and the binding site size on the pectin.

Previous work has also revealed that interactions between β -lg and pectin occurred via charged molecules and hydrogen bonding (Girard et al., 2002: Chapter 2). To identify potential interacting zones on the β -lg, the interactions between four peptides on the outer surface of β -lg and pectin were probed (Figure 3.1). The peptides β -lg 1-14 and 76-83 were selected because of their positive net charge at acidic pH. β -lg 41-60 is a tryptic peptide with good emulsifying properties (Turgeon et al., 1992a, b). The peptide β -lg 132-148, which is part of the α -helix, was shown to interact with the acacia gum (Schmitt et al., 2001).

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 Materials

Bovine β -lg AB 95% pure protein (3X crystallized) was purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON, Canada) and used without further purification. Peptides β -lg 1-14 (LIVTQTMKGLDIQK), 41-60 (VYVEELKPTPEGDLEILLQK), 76-83 (TKIPAVFK), and 132-148 (ALEKFDKALKALPMHIR) were synthesized by the Eastern Quebec Proteomics Core facility (Fastmoc technology) and used as received. Low-methoxyl pectin (DE 28.3%, apparent molecular weight 94.3 kDa) and high-methoxyl pectin (DE 73.4%, apparent molecular weight 105 kDa) were provided by Hercules Copenhagen A/S (Copenhagen, Denmark). All reagents were of analytical grade and used as received.

3.4.2 Preparation of solutions

β -lg, peptides β -lg 1-14, 41-60, 76-83, and 132-148, as well as low- or high-methoxyl pectin (LM- or HM-pectin) were dispersed in 5 mM sodium phosphate buffer and stored overnight at 4°C to ensure the complete hydration of molecules. The pectin and protein or peptide solutions were mixed at molar ratios between 4:1 and 40:1 for protein/pectin solutions and between 5:1 and 95:1 for peptide/pectin solutions keeping the pectin concentration constant at 5 μ M. All calculations involving β -lg were made using the monomeric form as the unit. The pH of mixed protein/pectin solutions was adjusted to 4, 5, or 6 and at pH 4 for the peptide/pectin solutions. Measures on protein/pectin solutions at pH 5 in 50 mM sodium phosphate buffer were also carried out. The mixtures were stored overnight at 22°C for interactions between molecules to occur.

3.4.3 Frontal analysis continuous capillary electrophoresis

Protein-polyelectrolyte interactions were studied with frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE) (Wang and Dubin, 1998; Hattori et al., 2000). FACCE

is used to study slow binding kinetic systems since the equilibrium in the sample vial is reached prior to the analysis. FACCE is an interesting technique for binding studies, because it is not affected by the Donnan exclusion effect observed with ultrafiltration membranes (Timmer et al., 1998; Noiseux et al., 2001; Girard et al., 2002: Chapter 2). FACCE differs from conventional CE methods as it provides continuous sampling throughout the analysis. Thus, each charged molecule is detected as a continuous plateau instead of a peak. Generally 1 or 2 plateaus are obtained since the polysaccharide is often undetected. Under a positive polarity (i.e., anode to cathode migration), the first eluting plateau corresponds to the free protein, which is positively charged. The second plateau is added to the first and corresponds to the protein complexed with the polysaccharide (Gao et al., 1997). The concentration of the free protein was determined using a calibration curve from known protein concentrations.

FACCE was carried out on a Hewlett-Packard HP^{3D}CE provided with a UV diode array detector (Agilent Technologies Inc, Mississauga, ON, Canada). The bare-fused-silica capillary used (i.d. 50 μ m) had a total length of 33 cm and an effective length of 24.5 cm (Agilent Technologies Inc, Mississauga, ON, Canada). The temperature of the cassette was maintained at $22 \pm 0.1^\circ\text{C}$. The detection wavelength was 200 nm to prevent pectin from absorbing. Before each analysis, the capillary was flushed with NaOH 0.1 N for 3 min and equilibrated for 5 min with 5 or 50 mM sodium phosphate buffer at sample pH. The sample was introduced electrokinetically in the capillary (intrinsic to the FACCE method) for 30 min with 9 kV applied with positive polarity. The capillary was rinsed daily with NaOH 0.1 N 15 min, followed by water for 5 min and then dried.

3.4.4 Ultrafiltration

Interactions between peptides and LM-pectin were studied with an ultrafiltration method previously described (Noiseux et al., 2001; Girard et al., 2002: Chapter 2). Peptide/pectin mixtures were shaken gently; 100 μ L of the mixtures were ultrafiltered by centrifugation at 10,000 g for 25 minutes at 22°C through 10 kDa MWCO Microcon® devices (Millipore, Bedford, MA). The membrane retained the pectin and the complexes,

while the free peptides passed through the membrane. The free peptides recovered in the ultrafiltration permeate were assayed with the bicinchoninic acid assay (Smith et al., 1985).

3.4.5 Calculation of the binding parameters

Given the non-specific nature of the complexation and the large size of the ligand (protein) relative to the macromolecule (pectin), the mathematical model used had to take into account the possibility of overlapping binding sites. Namely, the fact that β -lg could occupy more than one binding site on the pectin had to be considered so as to prevent any overestimation of the potential binding sites on the pectin. According to the binding model of McGhee and von Hippel (1974) adapted from the Scatchard plot (Scatchard, 1949), complexation between ligand and macromolecule, including ligand-ligand interactions, can be expressed with the equation 22.

$$(22) \quad \frac{v}{L} = K(1-nv) \times \left(\frac{(2\omega-1)(1-nv)+v-R}{2(\omega-1)(1-nv)} \right)^{n-1} \times \left(\frac{1-(n+1)v+R}{2(1-nv)} \right)^2$$

$$R = \sqrt{(1-(n+1)v)^2 + 4\omega v(1-nv)}$$

Where L is the free ligand concentration (M), K is the binding constant (M^{-1}), n is the average size of the binding site (D-galA residues covered with a β -lg monomer), v is the binding density (number of β -lg complexed per D-galA residue), and ω is the cooperativity parameter (unitless). The cooperativity parameter assesses ligand-ligand interactions. It has a negative value when the interactions are repulsive or anticooperative, a positive value for attractive or cooperative interactions, and is null when no interactions are involved between ligand molecules.

Results obtained with FACCE and UF were used to obtain the binding isotherms of the β -lg or peptide/LM- or HM-pectin mixtures through plotting the binding density (v) against the free β -lg concentration (L). The L parameter could be directly calculated from the FACCE and UF results. Given that the LM- and HM-pectin used contained 80% of D-galA and that their apparent molecular weights are known, their average D-galA content

was approximated to 420 and 507 residues per LM- and HM-pectin molecule, respectively. Therefore, the v parameter could be obtained from the total β -lg or peptide molecules complexed divided by 420 and 507. The saturation of pectin estimated from the binding isotherms made it possible to calculate the binding stoichiometry (N) expressed as β -lg or peptide molecules per pectin molecule.

The binding constant, cooperativity parameter, and binding site size could be determined by the non-linear least square fitting of v/L plotted against v . Each β -lg or peptide/pectin ratio was assessed in duplicates. The JMP IN® software was used for the curve fitting (SAS Institute Inc, USA).

3.5 RESULTS

Figure 3.2 shows a typical electropherogram obtained for the β -lg containing solutions. The single plateau corresponds to the UV-absorbance of the free β -lg, which was positively charged. Similar results obtained with UF (results not shown) confirmed that the single plateau was not caused by similar migration times of the free and complexed protein. The absence of the second plateau is explained by the lack of positive charges on β -lg/pectin complexes, which prevented their introduction into the capillary.

The binding isotherms of the β -lg/LM-pectin mixtures at pH 4, 5, and 6, and in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 5 are illustrated on Figure 3.3. The amount of β -lg complexed with LM-pectin was negligible at pH 6. At pH 5, the amount of β -lg/LM-pectin complexes dramatically decreased as the phosphate buffer concentration was increased from 5 to 50 mM. At this pH, there was about 0.018 and 0.003 β -lg molecule complexed per D-galA residue for a free β -lg concentration around 15 μ M in 5 and 50 mM phosphate buffer, respectively. At pH 4 in 5 mM phosphate buffer, 0.025 monomer of β -lg were complexed on each D-galA residue, corresponding to the appearance of a small plateau at free β -lg values between 15 and 20 μ M. From these binding isotherms, the saturation of a D-galA residue with β -lg could be approximated with the end of the curves. At this point, the higher amount of complexed β -lg with an increasing protein/pectin ratio was almost stopped indicating pectin saturation. A D-galA residue of the LM-pectin reached saturation at 0.019 and 0.055 β -lg molecule in 5 mM phosphate buffer at pH 5 and 4 respectively. At pH 5 in a 50 mM phosphate buffer, the saturation of a D-galA residue was reached with 0.008 β -lg molecule. Figure 3.4 shows the binding isotherms obtained with the HM-pectin. At free β -lg concentration around 15 μ M in 5 mM phosphate buffer, an average of 0.002 and 0.015 β -lg molecule is complexed on each D-galA residue at pH 5 and 4 respectively. There were no more β -lg molecules complexed at pH 5 with a 50 mM phosphate buffer concentration. At pH 5 and 4, the D-galA residue reached saturation at 0.003 and 0.025 β -lg molecule, respectively. No significant complexation was noticed at pH 6 (not shown).

Given that there were approximately 420 and 507 D-galA residues per LM- and HM pectin molecules respectively, the binding stoichiometry (N) of complexes could be calculated using the pectin saturation values presented above and reported in Table 3.1. At pH 5 and 4, approximately 23 and 8 β -lg monomers were complexed per LM-pectin molecule and 13 and 2 β -lg monomers were complexed on the HM-pectin. The binding constants (K) show that LM-pectin is more reactive than the HM-pectin as it was the case with the binding isotherms. The binding constant decreased at higher pH values. The positive cooperativity values (ω) indicate an attractive interaction between β -lg molecules, especially as they complex with the LM-pectin at pH 5. Consequently, the β -lg molecules would be complexed on the pectin, preferably near one another. The binding site size values n on LM-pectin show that a β -lg monomer covers about 15 D-galA residues, except at pH 5 where the β -lg covered approximately 50 residues. Under the same conditions, the HM-pectin would have a binding site slightly larger than that of the LM-pectin. An increasing concentration of the phosphate buffer leads to lower values of binding stoichiometry, binding constant, cooperativity, and binding site size.

In order to identify the potential reactive zones on the β -lg, assays were carried out under the most reactive conditions i.e., with LM-pectin at pH 4. FACCE was not used with peptides because of serious migration difficulties and lack of reproducibility. The peptides should be analyzed with a coated capillary to prevent interactions between the negative silanol groups on the capillary wall and the positive charges of the peptides. Therefore, the ultrafiltration technique was used to study the interactions between the four selected peptides (i.e., β -lg 1-14, 41-60, 76-83, and 132-148) and the LM-pectin. From the free peptide concentrations L , the binding density values v could be determined.

Binding isotherms obtained by means of plotting the binding density against the free peptide concentrations are presented in Figure 3.5. At a free peptide concentration around 50 μ M, an average of 0.005, 0.01, 0.04, and 0.06 molecules of the peptides β -lg 1-14, 41-60, 132-148, and 76-83, respectively, were complexed on each D-galA residue. From these binding isotherms, the approximated saturation of a D-galA residue with peptides β -lg 1-14, 41-60, 132-148, and 76-83 were respectively 0.02, 0.04, 0.06, and 0.07 molecule. The

stoichiometry values of the peptide/LM-pectin complexes are presented in Table 3.2. Binding constants values (K) of the different peptides increased, as did the cooperativity parameter and stoichiometry values. The cooperative values (ω) showed attractive interactions between the peptides complexed on the LM-pectin. All peptides covered about 15 D-galA residues. Although the binding constants for the peptides β -lg 41-60 and 132-148 were almost equivalent, the stoichiometry and the cooperative behavior for β -lg 41-60 are not as pronounced as those obtained for the peptide β -lg 132-138.

3.6 DISCUSSION

The β -lg/pectin complexes are maintained by ionic interactions and hydrogen bonding (Girard et al., 2002: Chapter 2). Thus, the pectin is not complexed through the hydrophobic zone of the protein as it was observed for small ligands, such as retinol, retinoic acid, palmitate, and cholesterol (Sawyer and Kontopidis, 2000). The stoichiometry of the complexes drops off with increasing pH values, because of the negative net charges appearing over the isoelectric point (IEP) of the protein (5.1). Hence, the amount of β -lg complexed on pectin is greatly increased under the protein's IEP. The pH and ionic strength are parameters that mainly influence electrostatic interactions (Burgess, 1990; van Oss, 1993; Xia and Dubin, 1994). The amount of β -lg (18 kDa) complexed on each LM-pectin molecule (94.3 kDa) at pH 4 is quite high considering the relative molecular weights of the molecules. Under the same conditions, isothermal titration calorimetry (ITC) revealed that interpolymer complexes had a binding stoichiometry of 25 β -lg monomer/LM-pectin (Girard et al., 2003: Chapter 4). Also, the plateau noticed at pH 4 may indicate that a critical binding stoichiometry may be needed to achieve a higher complexation extent. According to the Tainaka theory (Tainaka, 1979, 1980), protein and polyelectrolyte complexation is a two-step process. The first step corresponds to the formation of intrapolymer complexes, whereas the second is the aggregation of the latter to obtain interpolymer complexes. At pH 5, only 8 lg monomers were complexed with LM-pectin. This value corresponds to the binding stoichiometry of β -lg/LM-pectin intrapolymer complexes at pH 4 measured with ITC (Girard et al., 2003: Chapter 4). Consequently, β -lg/LM-pectin intrapolymer complexes probably aggregate in interpolymer complexes between pH 4 and 5.

The electrostatic nature of the interactions is confirmed by the screening effect on both β -lg and pectin charges as the buffer concentration increases from 5 to 50 mM. The increased ionic strength decreases the initial pH of intrapolymer and interpolymer complexes formation. Therefore, an increase in ionic strength reduces the amount of interpolymer complexes and consequently the binding stoichiometry and binding constants. Even though HM-pectin had a higher molecular weight than the LM-pectin, there were

always fewer amounts of complexed protein molecules as well as lower binding constants. This is explained with the higher amounts of carboxyl groups on the LM-pectin involved in the interaction with the β -lg. FACCE has shown that 13 and 23 β -lg monomers were complexed at pH 4 on the HM-pectin and LM-pectin respectively. The stoichiometry value obtained with HM-pectin is almost half the value obtained previously with ITC (Girard et al., 2003: Chapter 4). This difference could be explained by the polarizing effect of the electric field used in CE that could decrease, to some extent, hydrogen bonding in the complexes. Hydrogen bonding was shown to be more important in the complexes containing HM-pectin compared to those containing LM-pectin (Girard et al., 2002: Chapter 2). Interactions were stronger with lower pectin DE, because of the higher amount of carboxyl groups responsible for the interactions with the β -lg. It was previously shown with ultrafiltration that LM-pectin was more reactive with β -lg than with HM-pectin (Girard et al., 2002: Chapter 2).

The complexation may reveal a cooperative behavior between protein molecules (Li et al., 1996), which can be detected from both the curvature of the binding isotherm and the fitting values. As for the binding isotherm, it was not always clear whether or not the complexation was cooperative. However, it was obvious from the fitting values that the β -lg molecules complexed on the LM-pectin were cooperative. The pH and ionic strength had a moderate-to-high effect on the cooperative behavior of β -lg/LM- or HM-pectin mixture complexes. The higher cooperativity at pH 5 in 5 mM phosphate buffer can be explained by the protein's weak net charge around its IEP, which promotes β -lg/ β -lg interaction. The lower cooperative behavior observed at pH > IEP is explained by the net negative charge of the protein resulting in coulombic repulsion between the β -lg molecules. Moreover, the lower cooperativity observed at pH 4 is also explained by repulsive forces between the positively charged β -lg molecules. The screening effect by the higher buffer concentrations lowered the attraction between the molecules and then the cooperativity. The noncooperative behavior of β -lg with HM-pectin at pH 5 can be explained by the lower amounts of carboxylic groups. These groups are sufficiently dispersed on the backbone of the pectin to prevent the protein molecules from complexing near one another. A previous study showed that the β -lg was highly cooperative ($\omega = 128$) with sodium polystyrene

sulfonate (NaPSS) at pH 7.5 in 100 mM phosphate buffer and least cooperative ($\omega = 3$) at pH 6.7 in 50 mM of the same buffer (Gao et al., 1998).

There is a tendency for the HM-pectin to have a larger binding site size. This trend is hard to explain since β -lg was expected to occupy the same volume while complexing on LM- or on HM-pectin. The larger binding site size observed at pH 5 for LM- and HM-pectin can be explained by β -lg/ β -lg interactions around protein's IEP. A β -lg molecule interacting with other protein molecules may occupy a larger space on the pectin. This is in agreement with the higher cooperativity observed at this pH value for LM-pectin. The binding site size of the β -lg/sodium poly (2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate) complexes was dependent of both pH and ionic strength (Hattori et al., 2000). However, the binding site size of the β -lg/NaPSS complexes was independent of the pH and ionic strength because of the hydrophobic interactions involved (Gao et al., 1998).

The negatively charged macromolecules would interact with β -lg at more than one binding site (Fogolari et al., 2000). Consequently, the pectin is likely to interact through more than one amino acid zones on the β -lg. Circular dichroism revealed the involvement of the α -helix of β -lg in the interaction with acacia gum (Schmitt et al., 2001). However, this technique could not be used to identify interacting zones having no particular secondary structures. The potential interacting zones on the β -lg are supposed to be positively charged and located on the outer surface of the protein.

Ultrafiltration and the overlapping binding site model were used to determine the binding parameters of the four selected β -lg peptides/LM-pectin complexes. The β -lg peptides had their stoichiometry, binding constants, and cooperativity parameter in decreasing order: 76-83, 132-148, 41-60, and 1-14. The primary structures of the peptides can explain these reactivity differences. The peptide β -lg 76-83 was the most reactive, because of its small size and its 2+ net charge from the Lys₇₇ and Lys₈₃ residues. The second most reactive peptide was the β -lg 132-148 with a 3+ net charge. It had 5 positive charges coming from the Lys₁₃₅, Lys₁₃₈, Lys₁₄₁, His₁₄₆, and Arg₁₄₈ residues and 2 negative charges originating from the Glu₁₃₄ and Asp₁₃₇ amino acids that are still not protonated at pH 4 (Fogolari et al., 2000). According to its net charge, the peptide β -lg 132-148 should be

the most reactive one. However, this peptide has a higher molecular weight (1981 Da) than the sequence β -lg 76-83 (903 Da) and the Phe₁₃₆ and Ala₁₃₉ reactive residues are in a hydrophobic patch (Ragona et al., 2002). The peptide β -lg 41-60 was the third most reactive peptide followed by β -lg 1-14, being the least reactive one. The peptide β -lg 41-60 has a -1 net charge at pH 4 resulting from two positively charged Lys₄₇ and Lys₆₀ amino acid residues and from three negatively charged Glu₅₁, Asp₅₃, and Glu₅₅ amino acids residues (Fogolari et al., 2000). The peptide β -lg 1-14 had a $+1$ net charge due to the protonated Lys₈ and Lys₁₄ residues and the Asp₁₁ residue that is still ionized at pH 4 (Fogolari et al., 2000). Given their net charge, the peptide β -lg 1-14 was expected to be more reactive than the 41-60. However, this latter peptide is believed to interact with pectin through hydrogen bonding with its four glutamic acid residues, especially Glu₅₁ and Glu₅₅, which are still ionized at pH 4.

The binding site sizes on the LM-pectin were around 15 D-galA residues for the peptides β -lg 1-14, 73-83, and 132-148 and 8 D-galA residues for the peptide β -lg 41-60. The lower binding site size of the β -lg 41-60 can be explained by the Pro₄₈ and Pro₅₀ residues that possibly induced some turns in the peptide. Therefore, both lysine residues could have gotten closer and lowered the binding site size or the turn could have limited the interaction with the pectin to one lysine residue.

Results show that β -lg would interact on two zones containing first the peptides β -lg 1-14, 41-60, and 73-76, because of their proximity on the tertiary structure of the β -lg and then through the β -lg 132-148, which corresponds to the α -helix zone. The dimer contact area involving the Asp₃₃, Ala₃₄, and Arg₄₀ residues on both monomers could influence the binding site (Sakurai et al., 2001). Binding site sizes and stoichiometry values calculated on the LM-pectin for the peptides were generally comparable to those obtained for the β -lg. This suggests that the β -lg could probably complex on the pectin through the four selected peptides studied.

3.7 CONCLUSION

The higher amounts of carboxyl groups enabled the LM-pectin to complex more proteins than HM-pectin. The β -lg could possibly complex on pectin through its amino acid zones 76-83, 132-148, 41-60, and 1-14. FACCE used with the overlapping binding site model is an efficient tool to carry out binding studies involving biopolymers such as proteins and polysaccharides. However, studies with peptides should be performed with coated capillaries to prevent their interaction with the capillary wall. FACCE is an inexpensive technique, because it requires only a small sample and no UF devices. FACCE was successfully used to obtain quantitative data on the β -lg/pectin complexes. The effect of the electric field on the dissociation of weak electrostatic complexes should be not neglected. Consequently, binding parameters and some thermodynamic aspects were assessed with isothermal titration calorimetry and presented in the Chapter 4.

Table 3.1 Binding parameters of β -lg/LM- or HM-pectin complexes calculated with the overlapping binding site model.

Mixtures	pH	Buffer (mM)	N	K (M^{-1})	ω	n (D-galA residues)
β -lg/LM-pectin	4	5	23	1431	18	12
	5	5	8	547	242	50
	5	50	3	166	12	11
	6	5	2	40	20	19
β -lg/HM-pectin	4	5	13	857	15	20
	5	5	2	235	18	68

Table 3.2 Binding parameters of the peptides β -lg 1-14, 41-60, 76-83, or 132-148/LM-pectin complexes at pH 4 in 5 mM phosphate buffer calculated with the overlapping binding site model.

Peptide/ LM-pectin	N	K (M^{-1})	ω	n (D-galA residues)
1-14	8	90	7	12
41-60	17	144	46	8
76-83	31	245	207	15
132-148	25	163	118	16

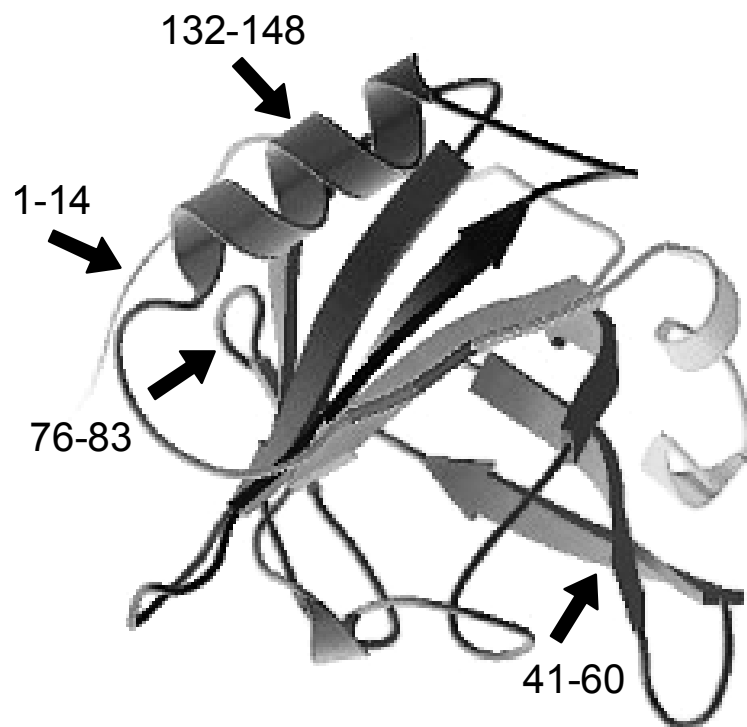


Figure 3.1 Localization of the selected peptides on the β -lactoglobulin molecule. β -lg structure was from Qin et al. (1998b) and was reproduced (3BLG image) from Protein Data Bank Server.

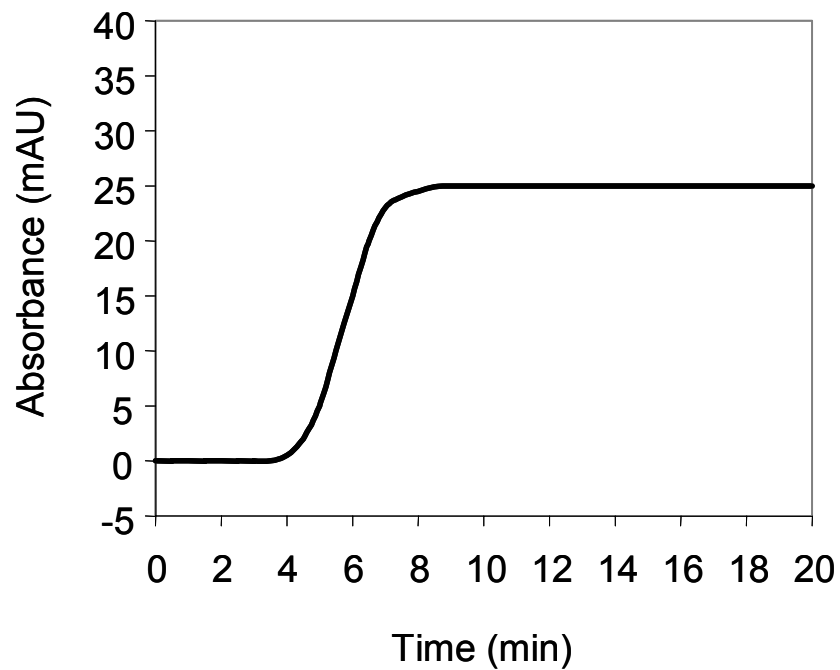


Figure 3.2 Typical electropherogram obtained for the β -Ig/LM- or HM-pectin complexes at 200 nm.

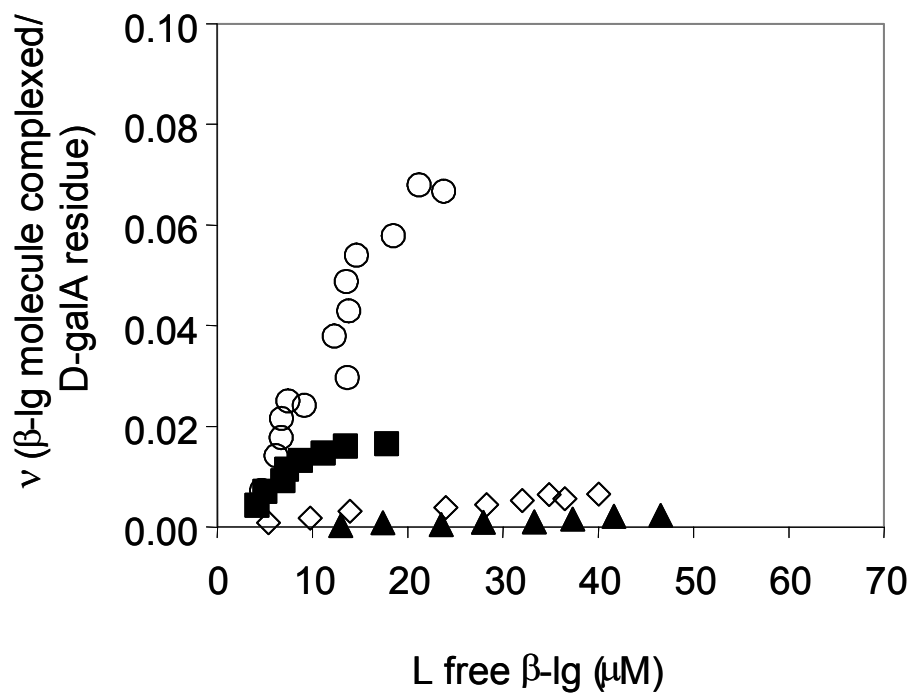


Figure 3.3 Binding isotherms of β -lg/LM-pectin mixtures in 5 mM phosphate buffer at pH 4 (○), 5 (■), and 6 (▲), and in 50 mM phosphate buffer at pH 5 (◇).

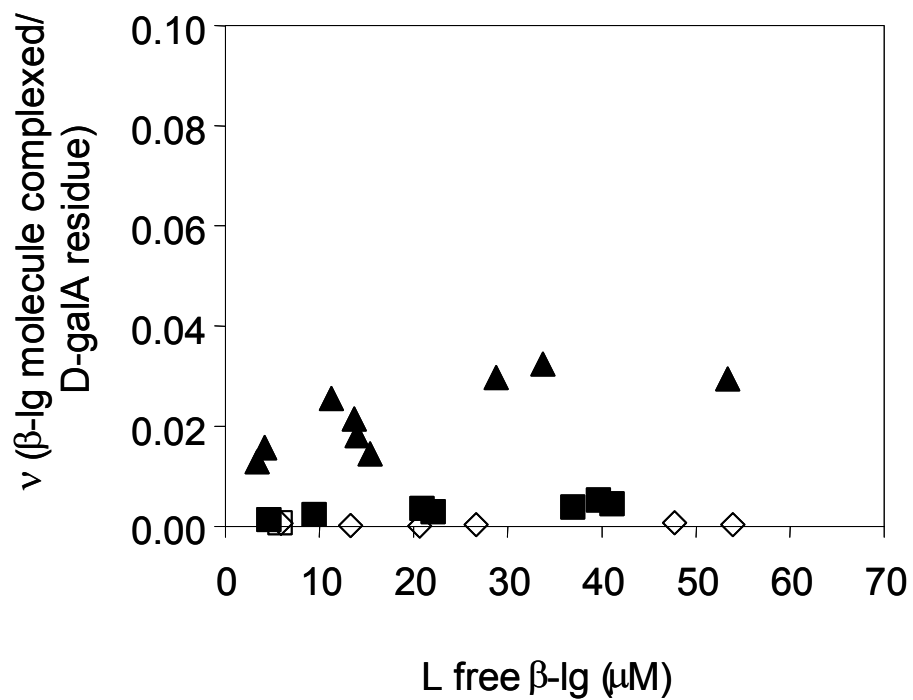


Figure 3.4 Binding isotherms of β -lg/HM-pectin mixtures in 5 mM phosphate buffer at pH 4 (▲) and 5 (□), and in 50 mM phosphate buffer at pH 5 (◊).

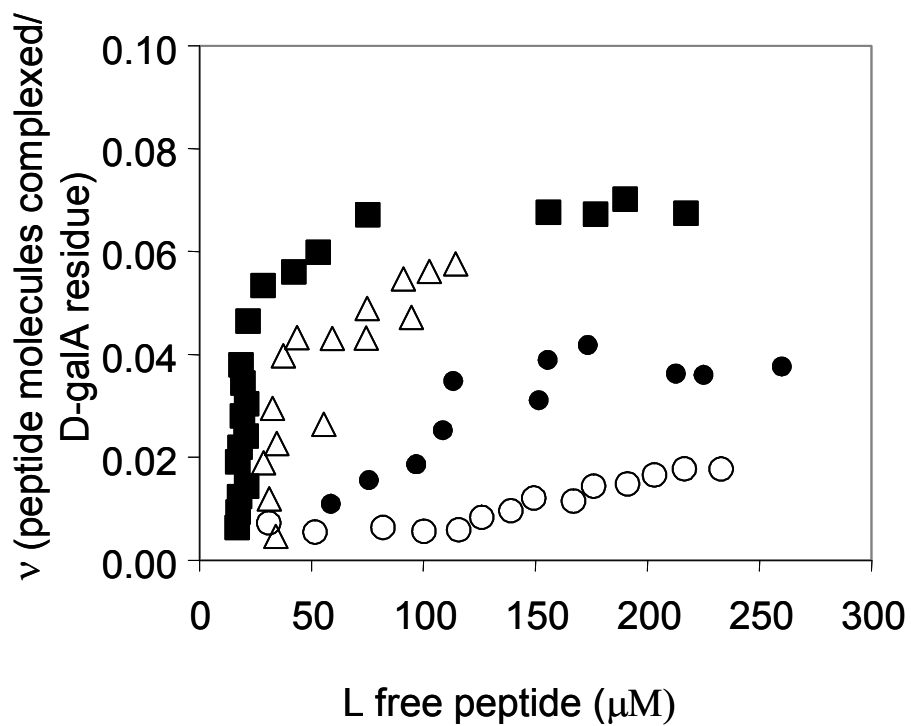


Figure 3.5 Binding isotherms of peptides β -lg 1-14 (○), 41-60 (●), 76-83 (■) and 132-148 (△)/LM-pectin complexes at pH 4 in 5 mM sodium phosphate buffer.

CHAPITRE 4: Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin/pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry

Maude Girard, Sylvie L. Turgeon & Sylvie F. Gauthier

Centre de recherche en sciences et technologie du lait STELA

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation

Université Laval

Québec, Qc, G1K 7P4, Canada

Publié dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 4450-4455.

4.1 RÉSUMÉ

Le titrage calorimétrique isothermique (ITC) a été utilisé pour déterminer la constante d'association, la stoechiométrie, l'enthalpie et l'entropie des complexes β -lactoglobuline (β -lg)/pectine faiblement ou hautement méthylée (pectine LM ou HM) à pH 4 et à 22°C. D'après les isothermes d'interaction, la complexation entre la β -lg et la pectine s'effectue en deux étapes correspondant à la formation de complexes intrapolymères suivie par une agrégation en complexes interpolymères. La complexation entre la β -lg et la pectine LM ou HM est spontanée lors de la formation des complexes intra et interpolymères avec une énergie libre de Gibbs approximative de $-10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. La formation des complexes intrapolymères est conduite par une enthalpie favorable alors que l'agrégation en complexes interpolymères est le résultat de facteurs enthalpique et entropique. Les valeurs négatives d'enthalpie mesurées en ITC pourraient être dues en partie à des changements conformationnels de la pectine et de la β -lg lors de l'interaction.

4.2 ABSTRACT

Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to determine the binding constant, stoichiometry, enthalpy, and entropy of β -lactoglobulin (β -lg)/low- or high-methoxyl pectin (LM- or HM-pectin) complexes at 22°C and at pH 4. The binding isotherms revealed the formation of soluble intrapolymer complexes further followed by their aggregation in interpolymer complexes. The interaction between β -lg and LM- or HM-pectin in intra and interpolymer complexes occurred spontaneously with a Gibbs free energy around -10 kcal·mol⁻¹. The intrapolymer complexes were enthalpically driven, whereas enthalpic and entropic factors were involved in the formation of interpolymer complexes. Because ITC did not allow dissociating different enthalpic contributions, the values measured as pectin and β -lg interacted could partially be attributed to conformational changes.

4.3 INTRODUCTION

The β -lactoglobulin (β -lg) is a small globular protein of 18,350 Da. The β -lg has a well-known structure containing mainly β -sheets, some β -turns, and one α -helix (Sawyer et al., 1999). Its quaternary structure is influenced by pH, mineral content, and temperature. This protein is monomeric at pH below 3 or above 8, dimeric at neutral pH, and found in both states between pH 4 and 6 (Taulier and Chalikian, 2001). The β -lg may form a few octamers around pH 4.5 (Pessen et al., 1985), but some authors are doubtful about the existence of such an assembly (McKenzie and Sawyer, 1967; Taulier and Chalikian, 2001). Pectin is a cell-wall polysaccharide, generally extracted from apple pomace or citrus fruits. This anionic polysaccharide is essentially made up of D-galA residus. High-methoxyl pectin (HM-pectin) occurs when more than 50% of its carboxylic groups are esterified, whereas low-methoxyl pectin (LM-pectin) is found when less than 50% of these groups are esterified (Voragen et al., 1995).

The interactions between proteins and polysaccharides can lead to the formation of complexes. These complexes, or coacervates, have many applications, including fat substitution (Laneuville et al., 2000), protein separation (Dubin et al., 1994), microencapsulation (Burgess, 1994), and enzyme immobilization (Kokufuta, 1992). The nature of protein/polysaccharide complexes is influenced by entropic factors, such as the structure, and the molecular weight of biopolymers. The complexes are also influenced by enthalpic forces, which are regulated by the protein/polysaccharide ratio and the nature and density of charges on the biopolymers. Many studies on protein/polysaccharide interactions have been carried out (Serov et al., 1985; Gurov et al., 1988; Tolstoguzov, 1991, 2002). Ultrafiltration used with destabilizing agents showed that interactions between β -lg and pectin occurred through ionic and hydrogen bonds, whereas the hydrophobic interactions were negligible (Girard et al., 2002: Chapter 2). The measurement of thermodynamic parameters, such as binding constant, enthalpy, entropy, and binding stoichiometry of interactions, is essential to accurately evaluate binding conditions. Binding parameters from biopolymer systems are sometimes hard to quantify because of the heterogeneity of the natural material. Consequently, few quantitative studies have been carried out on the

interactions between β -lg and polysaccharides (Girard et al., 2003: Chapter 3). Thermodynamic quantities involved in biopolymer interactions are often indirectly determined through non-calorimetric experimental methods (O'Brien et al., 2001). These methods involve the calculation of thermodynamic parameters from theoretical relationships.

Enthalpy variations (i.e., gain and loss) are the easiest thermodynamic parameters to measure during complexation. Isothermal titration calorimetry (ITC) is currently the only technique used to directly measure the enthalpy for many ternary mixtures (O'Brien et al., 2001). ITC was used to study the interaction between β -lg and LM- or HM-pectin at pH 4 in 5 mM of sodium phosphate buffer. To our knowledge, this technique has not yet been used to carry out a binding study involving two biopolymers having heterogeneous molecular weights.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Materials

Bovine β -lg A & B (3X crystallized) was purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, On, Canada) as 95% pure protein. Low-methoxyl pectin (DE 28.3%, apparent molecular weight 94.3 kDa) and high-methoxyl pectin (DE 73.4%, apparent molecular weight 118 kDa) were donated by Hercules Copenhagen A/S (Copenhagen, Denmark). All reagents were of analytical grade and used as received.

4.4.2 Preparation of solutions

To eliminate excess salts, β -lg and LM- and HM-pectin were dialyzed against deionized water for 24 hours at 4°C. Afterwards, β -lg and LM- or HM-pectin were dialyzed extensively in the same beaker against a 5-mM phosphate buffer (pH 4) to equilibrate the pH and ionic strength of the solutions. The weak concentration of the buffer was used to prevent dissociation of β -lg and pectin complexes, which are very sensitive to ionic strength as demonstrated earlier (Girard et al., 2002: Chapter 2). The dialysis buffer was preserved for ITC experiments. The dialysis was critical to avoid inaccuracies inherent to buffer mismatching. Ionic strength or pH differences could have lead to modifications in the dimer/monomer equilibrium of the β -lg (Taulier and Chalikian, 2001; Sakurai et al., 2001). The β -lg, LM- and HM-pectin solutions and buffer were filtrated through a 0.22- μ m membrane to eliminate insoluble particles. The concentration of dialyzed β -lg was measured with the bicinchoninic acid protein assay (Smith et al., 1985). The LM- and HM-pectin concentrations were assayed with the phenol-sulfuric acid method (Dubois et al., 1956). A dialysis buffer was used as solvent to adjust the LM- or HM-pectin and β -lg solutions around 10 and 1500 μ M (monomeric equivalent) respectively. All solutions were degassed 10 minutes at 20°C prior to ITC measurements by means of a device provided with the ITC apparatus.

4.4.3 Isothermal titration calorimetry (ITC)

An isothermal titration calorimeter (VP-ITC, Microcal Inc., Northampton, MA) was used to measure enthalpy values. After setting the temperature of solutions at 20°C in the degassing device, the apparatus was equilibrated at 22°C for at least half an hour before the measurement. The LM- or HM-pectin solution in the 1.445-mL reaction cell was titrated with 50 successive 5- μ L injections of β -lg solution. Each addition lasted 12 s with an interval of 800 s between consecutive injections. This long resting time between injections was necessary to reach thermodynamic equilibrium between injections. This equilibrium was attained when no more energy was released or absorbed in the reaction cell. The solution in the reaction cell was stirred at 310 rpm throughout the experiments. The heats of dilution from the blank titration of the β -lg into the buffer solution and the buffer into pectin solution were subtracted from the raw data. Measurements were carried out in duplicates.

Thermodynamic parameters, including binding constant (K), enthalpy (ΔH), entropy (ΔS), and binding stoichiometry (N) (molar ratio monomeric β -lg/pectin), were calculated by iterative curve fitting of the binding isotherms. The “2-binding-site” model from the software Microcal ORIGIN provided with the ITC apparatus was used. The Gibbs free energy was calculated from the equation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

4.4.4 Overlapping binding site model

An earlier binding study, involving the β -lg and pectin under similar experimental conditions, was carried out using a capillary electrophoresis (CE) method. The free β -lg was separated from the complexed β -lg by means of an electric field (Girard et al., 2003: Chapter 3). Raw data obtained with CE were subsequently treated with the mathematical overlapping-binding-site model (McGhee and von Hippel, 1974). According to this model, complexation between ligand and macromolecule including interacting ligand molecules can be expressed with the equation 22 (Chapter 3). The binding density of the overlapping binding site model has to be lower or equal to 1. Since more than one protein molecule is

expected to complex on a pectin molecule, the D-galA residue was used as the interacting unit instead of the whole pectin molecule used with the ORIGIN software.

ITC calorimetric data were transformed to obtain the binding density “v” and free β -lg concentration “L” values (Tomme et al., 1996). For each injection, the volume in the cell “vol” (L), the energy released “Q” (J), the enthalpy ΔH ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$), the β -lg amount “Xc” (mol), the β -lg concentration “ ΔX_t ” (M), and the pectin concentration “Mt” (M) were calculated. Consequently, the maximum energy value “Qmax” (J), the complexed ligand concentration “Xb” (M), and the complexed β -lg concentration were calculated with equations 22, 23 and 24.

$$(23) \quad Q_{\max} = \Delta X_{t_1} \times \Delta H \times \text{vol}$$

Where ΔX_{t_1} is the β -lg concentration after the first injection

$$(24) \quad X_b = (\Delta X_t \times Q) / Q_{\max}$$

$$(25) \quad X_t = X_c / \text{vol}$$

Given the apparent molecular weights and the fact that pectin contains 80% of D-galA residues, the average content of D-galA residues was estimated at 420 and 507 per LM- and HM-pectin molecule, respectively. The binding parameters L (M) and v (β -lg molecules complexed/D-galA residue) were calculated with equations 26 and 27.

$$(26) \quad L = X_t - X_b$$

$$(27) \quad v = (X_b \times N_A \times \text{vol}) / \text{Mt} \times \text{vol} \times N_A \times \text{D-galA}$$

Where N_A is the Avogadro number and D-galA is the average content of D-galA in a pectin molecule.

The non-linear curve fitting of v/L , plotted against v was used to obtain K, n and ω values. The JMP IN® software was used for the curve fittings and statistics (SAS Institute

Inc, USA). The ITC binding data according to the overlapping binding site model were then compared to CE data.

4.5 RESULTS

Raw results from ITC measurements of the β -lg/LM-pectin complexes are presented on the thermogram at the top of Figure 4.1. The peak areas correspond to the energy released by the cell containing the pectin at each β -lg injection. Because all the injections throughout the analysis released energy, the complexation between β -lg and LM-pectin is considered as exothermic.

Saturation of the LM-pectin with the β -lg was reached at a β -lg/LM-pectin molar ratio of about 26:1, as the energy released in the cell became null. The injections liberated about 2-3 $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ in the first third of the analysis. The energy released was relatively low considering that ITC analysis should have had at least 5-10 $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ peaks in the first two-thirds of the thermogram (O'Brien et al., 2001). However, the 0.1- μcal sensitivity of the VP-ITC model used provided accurate results with only 3-5 $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ liberated. It was hard to improve signal intensity through higher component concentrations because of the high viscosity brought on by the pectin. Moreover, the β -lg/pectin complexes increased the overall viscosity of a solution as it was demonstrated earlier (Wang and Qvist, 2000). This higher viscosity required a faster stirring leading to unacceptable baseline distortion. The higher viscosity also reduced the solution of β -lg in the cell, which, in turn, drastically slowed down the thermodynamic equilibrium between injections. Decreasing the number of injections to increase their volume did not improve results as complex binding isotherms were better described with many small injections rather than a few large ones.

The binding isotherm of β -lg/LM-pectin complexes is the integrated areas of heat peaks plotted against the molar ratios of components (Figure 4.1; bottom). Although the software integrates the peak areas automatically, it was recommended to adjust the baseline and to integrate the peaks manually for more accurate results. This binding isotherm had two inflexion points, which are generally indicative of two types of independent binding sites on the macromolecule. Two types of binding sites have been observed in an earlier binding study involving the protein p85, a subunit of phosphoinositide 3-kinase, and the tyrosyl phosphopeptides pY740 and pY751 (O'Brien et al., 2000).

Because of the non-specific nature of interactions and because the carboxyl group was the only interacting group on the pectin, the two inflexion points are more likely indicative of two different steps involved in the β -lg/pectin complexation rather than two different binding sites. For that reason, the expression “2-site model” was replaced here with the more appropriate “2-step model”. In the first step, the amount of β -lg complexed on pectin decreased with each injection until pectin was saturated corresponding to the first plate. Then, the second step begins with a plate where the same amount of β -lg molecules interact with each injection. Then, the pectin became gradually saturated with β -lg until no more energy was released. The x coordinates of inflexion points correspond to the sum of stoichiometry values of β -lg/LM-pectin complexes at each step. ITC measurements showed that the titration of β -lg with salt solutions was exothermic due to the shift in dimer/monomer equilibrium towards the dimer state (Sakurai et al., 2001). Blank titrations carried out were negligible showing that titration did not modify the equilibrium of dimeric β -lg at pH 4 or the pectin aggregation. Thus, the prior dialysis was effective to equilibrate the ionic strength and pH of phosphate buffer, β -lg and pectin solutions.

The thermogram at the top of Figure 4.2 shows raw data obtained for β -lg/HM-pectin complexes. First injections of β -lg in HM-pectin released between 2-3 $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$, as with LM-pectin. The complexation between β -lg and HM-pectin was also exothermic. The binding isotherm of β -lg/HM-pectin had two inflexion points, which indicates that two steps are also involved in the complexation process, as it was the case for LM-pectin (Figure 4.2). The saturation of the HM-pectin with the β -lg was reached at a molar ratio of about 24:1. There were no significant differences between the binding isotherms of β -lg interacting with LM- or HM-pectin. About 45% of the total interaction time was needed to achieve the first step, while 55% was required for the second step. The difference between the analysis lengths is explained by the initial HM-pectin concentration (9.43 μM), which was higher than that of LM-pectin (7.33 μM). Therefore, more injections were needed for the β -lg/HM-pectin mixture to reach equivalent molar ratios to β -lg/LM-pectin.

The curve fitting of the binding isotherms of β -lg/LM- or HM-pectin with the Microcal ORIGIN software was also used to calculate the binding stoichiometry of complexes, the binding constant, the enthalpy, the entropy, and the Gibbs free energy. The enthalpy is the only parameter that is model independent and corresponds to the energy released per mole of interacting β -lg. At high “c” value (see calculations below), the enthalpy on the binding isotherm can be approximated by the energy released on the first injections where all the β -lg molecules injected are complexed on the pectin. In the subsequent injections, pectin molecules become increasingly saturated with β -lg and only a part of the protein molecules injected is complexed, which explains the lowering of the energy released. Enthalpy values correspond roughly to -14 and -10 kcal·mol⁻¹ of β -lg injected for the LM- and HM-pectin respectively (Figure 4.1).

Because of the two inflexion points, both binding isotherms obtained were characteristic of two different events in the reaction cell. Thus, the model of the ORIGIN software appropriate to fit binding isotherms with two inflexion points was used in order to calculate the thermodynamic parameters of the two steps (Table 4.1). There were about 8 β -lg molecules complexed on the LM-pectin at the first step and 16 at the second step. 6 β -lg were complexed on the HM-pectin at the first step, which was significantly lower than what was obtained at the first step on the LM-pectin. The amount of β -lg complexed at the second step was not significantly different from the value obtained for the LM-pectin. The binding constants with LM- and HM-pectin at the first step were not statistically different. However, the second step had lower binding constants, which were about 10 times lower than the ones obtained during the first step. Enthalpy values were negative on the first and second steps for LM- and HM-pectin. The enthalpies, as a result of the interaction between β -lg and LM- or HM-pectin respectively were higher at the first steps (-12.6 ± 1.94 and -10.0 ± 0.6 kcal mol⁻¹) than at the second steps (-5.5 ± 0.7 and -3.6 ± 0.5). The entropy values of complexes containing respectively LM- and HM-pectin multiplied by the temperature were slightly negative at the first step (-2.5 ± 2.8 and -0.2 ± 0.04 kcal mol⁻¹) and positive at the second step (3.5 ± 0.5 and 4.1 ± 0.4 kcal mol⁻¹). The Gibbs free energy values were all negative and no significant differences were observed between interactions

at the first or at second step or between LM- or HM-pectin. Given its lower molecular weight, the LM-pectin would have reacted more with the β -lg than the HM-pectin did. However, there was no statistical evidence for that tendency.

When the binding constant and stoichiometry are known prior to an ITC experiment, the c value is calculated to determine the initial macromolecular concentration in the cell (Wiseman et al., 1989). The c value can be calculated using the binding constants of the β -lg/LM- or HM-pectin complexes to verify whether the initial concentrations of pectin in the cell were adequate. The c value is unitless and is calculated as follows:

$$(28) \quad c = K \times M_{\text{tot}} \times N$$

Where K is the binding constant, M_{tot} is the pectin concentration in the analysis cell at the start of the experiment and N is the binding stoichiometry. The ideal c value should be between 1 and 1000 and preferably between 10 and 100. At high c values, the binding isotherm has a square shape, which limits the use of fitting models. As a result, the slope of the curve can only be used to calculate the enthalpy of the reaction. Results obtained with ITC (K and N from Table 4.1) were used to verify if the pectin concentrations was appropriate. The c value was calculated for each step. Calculated c values for the β -lg/LM-pectin complexes were 1437 and 498 for the first and second steps respectively and 905 and 93 for the HM-pectin for the first and second steps respectively. All the c values were in the suitable range, except for the first step of the β -lg/LM-pectin, which exceeded 1000. However, the high LM-pectin concentration in the cell was justified by the need to reach an acceptable signal on the ITC apparatus. The c values around 1000 could explain the relatively high error margin observed in the binding constants K calculated with the non-linear fitting model. Moreover, these results show that higher concentrations used would have increased the error margin on the binding parameters calculated.

The binding isotherms generated by the ORIGIN software were also treated with the overlapping binding site model (McGhee and von Hippel, 1974). Using this model, the binding stoichiometry, binding site size, binding constant, and cooperativity values obtained from the ITC measurements for the second step of β -lg/LM- or HM-pectin

complexation were calculated. Binding parameters for the first step were not calculated because not enough points were available for the non-linear fitting (Figure 4.3). Therefore, the non linear least square fitting was achieved for values of v between 0.015 and 0.025 and between 0.010 and 0.030 for complexes with LM- and HM-pectin respectively.

Results obtained with the overlapping binding site model followed the same tendencies observed with the ORIGIN software. The overlapping model made it possible to calculate the binding site size covered by 1 β -lg molecule, which was 14 and 22 D-galA residues for LM- and HM-pectin respectively. The interpolymer complexes had a binding constant of 2128 M^{-1} with LM-pectin which was higher than the value 1233 M^{-1} obtained with the HM-pectin. One can see that the binding constants calculated with the overlapping binding model were much lower than those obtained with the ORIGIN software. In fact, the overlapping binding site model uses the main repetitive unit of the pectin (D-galA residues) in the calculation as the interacting unit, whereas the ORIGIN software considers the whole pectin molecule. Consequently, the amount of interacting units is much higher in the overlapping binding model, which leads to lower binding constants. The β -lg complexed with LM- or HM-pectin did not show any significant cooperative behavior.

4.6 DISCUSSION

The negative Gibbs free energy values show the spontaneous character of the interaction between β -lg and LM- or HM-pectin. However, the relatively long period needed for the system to reach equilibrium between injections showed that the β -lg/pectin complexes have a slow binding kinetics.

The existence of two steps involved in the β -lg/LM- or HM-pectin complexation process is in agreement with the Tainaka theory (Tainaka, 1979, 1980), which states that the complexes are formed in two steps passing from the molecular to the aggregated state. The Tainaka theory is adapted from the Veis-Aranyi theory (Veis and Aranyi, 1960) and can be applied to systems regardless of their charges density. The first step would correspond to the formation of soluble intrapolymer complexes (C1) between β -lg and pectin molecules. The second step would imply the aggregation of these intrapolymer complexes forming insoluble interpolymer complexes (C2). The isoenthalpic plateau observed in the binding isotherms ends when the β -lg/pectin ratio required to induce intrapolymer complex aggregation is reached. A light scattering study carried out on poly(vinyl alcohol) sulfate/proteins salt free systems at different ratios revealed that intrapolymer complexes did not aggregate as long as proteins were in excess (Tsuboi et al., 1996).

The lower stoichiometries and higher binding constants of C1 compared to C2 are the result of lower levels β -lg in the cell that can interact with pectin and the higher proportion of complexed β -lg on the pectin, respectively. The first step was obviously enthalpically driven principally because of the direct interaction between the β -lg and pectin ionized carboxylic groups, which were shown to be located mainly in the smooth region of the pectin (Voragen et al., 1995). The unfavorable entropy observed at the first complexation step is in agreement with the Tainaka theory, which states that C1 have poor conformational entropy. It was previously shown that the formation of protein/polyelectrolyte complexes was driven by electrostatic interactions that could be

partially encountered by a loss in polyelectrolyte conformational freedom (Mattison et al., 1999).

According to the Tainaka theory, the process called complexation begins at the second step where C1 aggregate to form C2. Results show that enthalpic and entropic contributions support this second step. The favorable enthalpic contribution would result from the interaction of β -lg with the residual net negative charge on the C1. The overlapping of intrapolymer complexes leads to an electrostatic energy gain resulting from the increased ion density in the overlapped domain (Tainaka, 1979, 1980; Burgess, 1990). The positive entropic contribution at the second step essentially the product of the rearrangement of C2 in the solution and of the dilution of the concentrated phase containing the C2 (Veis and Aranyi, 1960; Piculell and Lindman, 1992; Tolstoguzov, 1997). The presence of C1 and C2 was also observed with the BSA/PDMDAAC (bovine serum albumin/poly(dimethyldiallylammonium chloride) mixture (Mattison et al., 1995; Xia et al., 1993). The enthalpy values measured with ITC are the sum of contributions coming from the interaction between β -lg and pectin, conformational changes, and aggregation of molecules (O'Brien et al., 2001). Hence, the enthalpy value measured could have been either overestimated or underestimated depending on the possible conformational changes in the molecules.

Monte Carlo simulations showed that at low ionic strengths, a polyelectrolyte chain would wrap around an oppositely charged spherical particle (Chodanowsky and Stoll, 2001; Brynda et al., 2002). The entropically favorable release of counterions and water molecules at the time of complexation (Piculell and Lindman, 1992; Tolstoguzov, 1997) may have been compensated by the negative entropy arising from conformational changes in the pectin. The exothermic reaction observed between maltodextrin and SDS can be explained by conformational changes in the maltodextrin (Wangsakan et al., 2001).

Measures with circular dichroism revealed the partial disappearance of the β -lg α -helix as it interacts with the acacia gum at pH 4.2 (Schmitt et al., 2001). Conformational changes are also suspected on the ribulose diphosphate carboxylase and on the 11s broad bean globulin once complexed with the LM-pectin (Tolstoguzov, 1991). A contribution to

enthalpy could also come from the possible aggregation of proteins around pH 4. To verify the accuracy of the binding parameters obtained with ITC, the calorimetric data treated with the overlapping binding site model were compared to those obtained with CE in a previous study (Girard et al., 2003: Chapter 3).

The total stoichiometry values for ITC and CE were respectively 25 and 23 monomers of β -lg complexed per LM-pectin molecule. However, the stoichiometry values calculated for the β -lg/HM-pectin complexes were higher with ITC (21) than with CE (13). This could be explained by a partial dissociation of β -lg/HM-pectin complexes during the CE analysis due to the electric field. The lower binding constant obtained at the second step is indicative of weaker interactions in β -lg/HM-pectin interpolymer complexes compared to those obtained with LM-pectin. A previous study using ultrafiltration and destabilizing agents demonstrated that β -lg/HM-pectin interpolymer complexes were more likely dissociated with higher pH values or ionic strengths than β -lg/LM-pectin complexes (Girard et al., 2002: Chapter 2). The binding constant at the second step of the β -lg/LM- or HM-pectin complexes obtained with ITC were respectively 2128 and 1233 M^{-1} compared with 1431 and 857 M^{-1} calculated with capillary electrophoresis for the same mixture (Girard et al., 2003: Chapter 3). The binding constant values obtained by ITC, were higher than those found with capillary electrophoresis. This binding parameter calculated from enthalpy values may have been overestimated, because of conformational changes involved in pectin and β -lg molecules as they are complexing. The binding site sizes calculated with ITC (14 and 22 D-galA) were similar to those obtained with capillary electrophoresis (12 and 20 D-galA) for the LM- and HM-pectin respectively (Girard et al., 2003: Chapter 3). Contrary to what was observed with capillary electrophoresis, the β -lg complexed with LM- or HM-pectin did not show any significant cooperative behavior. The complexes analyzed with capillary electrophoresis were “T” as the β -lg and pectin solutions were mixed before the acidification. The ITC complexes were “M” since β -lg and pectin solutions were at pH 4 before mixing. The “T” and “M” complexes were shown to have cooperative and non-cooperative behaviors respectively (Tolstoguzov, 1986).

4.7 CONCLUSION

Isothermal titration calorimetry is a useful tool for carrying out binding studies with biopolymers. The low cost of the food biopolymers makes them ideal molecules for studies in ITC, which requires a substantial amount of sample. ITC was used to characterize the formation of β -lg/LM- or HM-pectin complexes. The complexation is believed to occur in two steps as predicted by the Tainaka theory. Enthalpic contribution from conformational changes in pectin and β -lg molecules may have lead to an overestimation of binding parameters. Static light scattering at low angles was used to determine the diameter and the phase separation kinetics as β -lg/pectin complexes are formed in order to validate the β -lg/pectin intrapolymer and interpolymer complexes formation.

Table 4.1 Thermodynamic parameters of β -lg/LM- or HM-pectin complexes at pH 4 in 5 mM sodium phosphate buffer determined with the Microcal ORIGIN software.

Thermodynamic parameters	β -lg/LM-pectin		β -lg/HM-pectin	
	Step 1	Step 2	Step 1	Step 2
N	8.3 ± 0.9	16.5 ± 1.0	6.1 ± 0.5	15.1 ± 0.7
K (M^{-1})	$(4.5 \pm 2.6) \times 10^7$	$(4.5 \pm 3.0) \times 10^6$	$(1.9 \pm 1.0) \times 10^7$	$(6.3 \pm 3.5) \times 10^5$
ΔH ($kcal \cdot mol^{-1}$)	-12.6 ± 1.9	-5.5 ± 0.7	-10.0 ± 0.6	-3.6 ± 0.5
$T\Delta S$ ($kcal \cdot mol^{-1}$)	-2.5 ± 2.8	3.5 ± 0.5	-0.20 ± 0.04	4.1 ± 0.4
ΔG ($kcal \cdot mol^{-1}$)	-10.4 ± 4.8	-9.1 ± 1.2	-9.9 ± 0.6	-7.7 ± 0.9

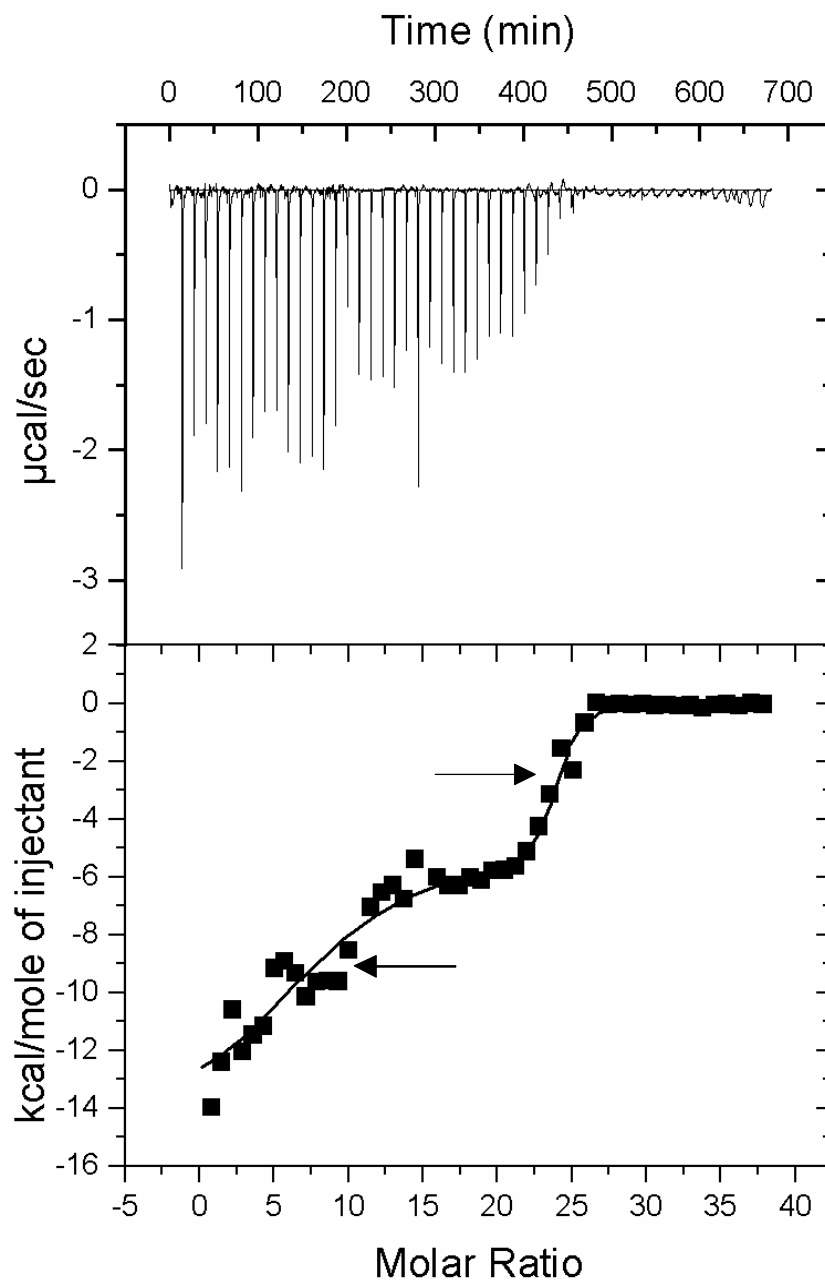


Figure 4.1 Thermogram (top) and binding isotherm (bottom) of the β -lg complexing with LM-pectin at pH 4 in 5 mM sodium phosphate buffer. Arrows indicate the 2 inflexion points.

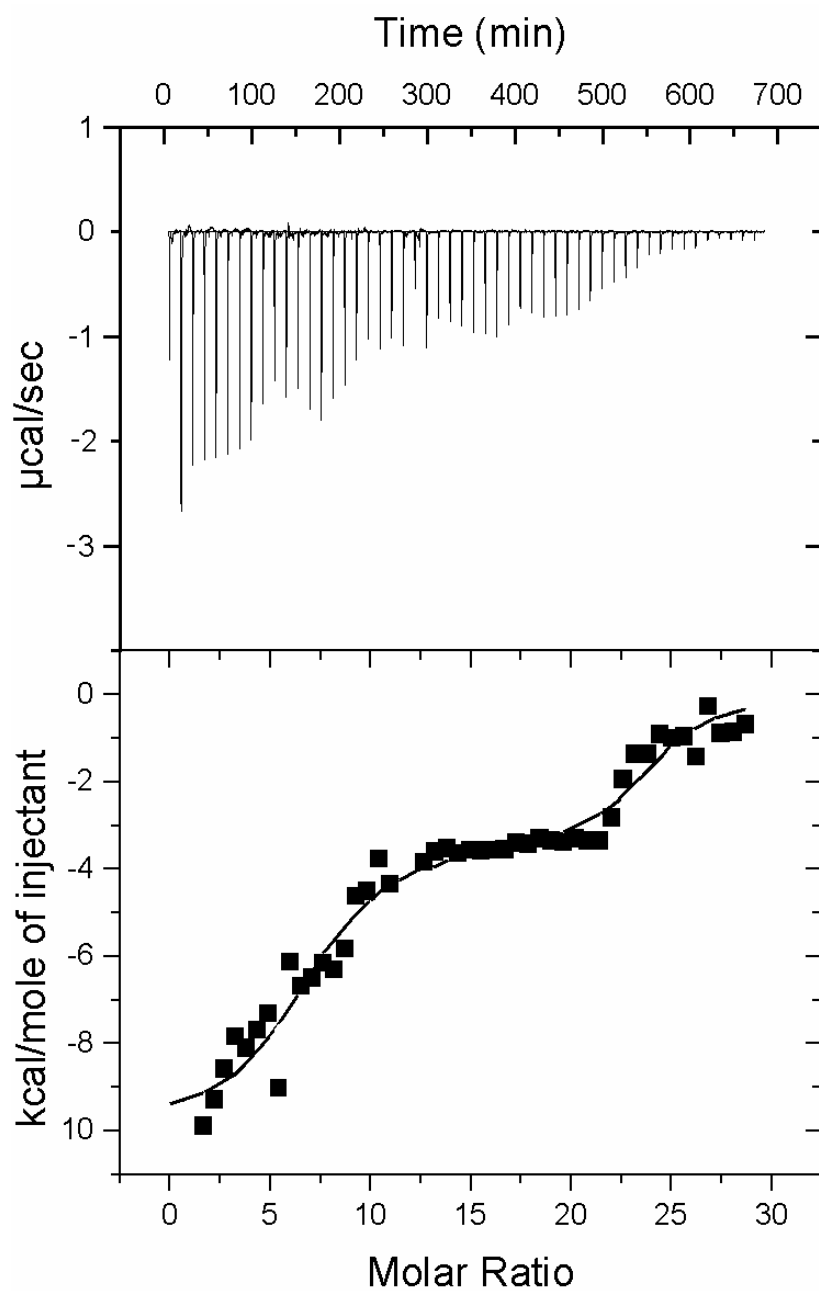


Figure 4.2 Thermogram (top) and binding isotherm (bottom) of the β -Ig complexing with HM-pectin at pH 4 in 5 mM sodium phosphate buffer.

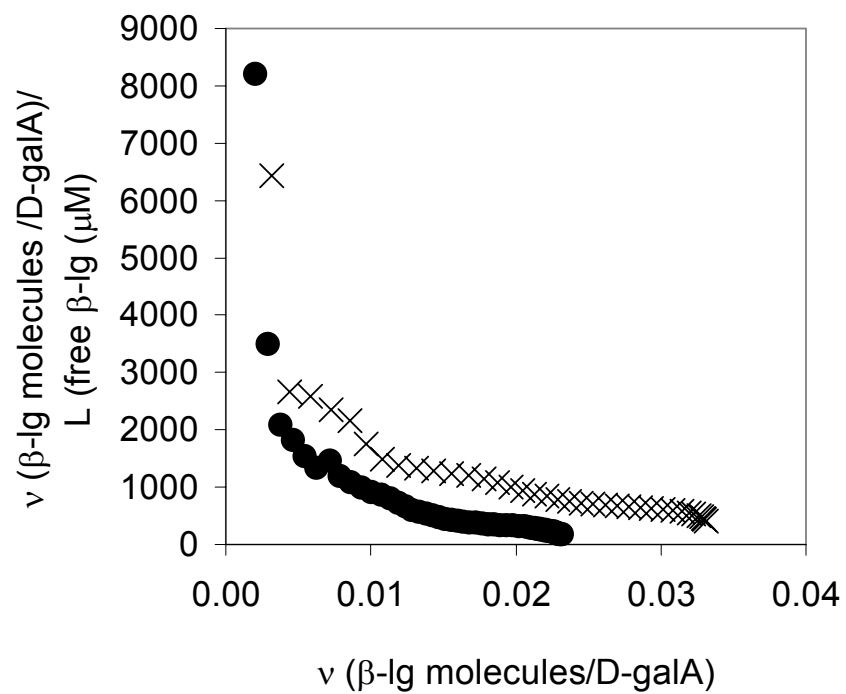


Figure 4.3 Scatchard plots of the β -lg/LM-pectin (X) and HM-pectin (●) mixtures at pH 4 in 5 mM sodium phosphate buffer.

CHAPITRE 5: Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: A kinetic study by small angle static light scattering

Maude Girard^a, Christian Sanchez^b, Sandra Laneuville^a, Sylvie L. Turgeon^a
& Sylvie F. Gauthier^a

^aCentre de recherche en sciences et technologie du lait STELA

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation

Université Laval

Québec, Qc, G1K 7P4, Canada

^bLaboratoire de Physico-Chimie et Génie Alimentaires

ENSAIA-INPL, 2 avenue de la Forêt-de-Haye BP176, 54505

Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

soumis au journal *Langmuir*

5.1 RÉSUMÉ

Une séparation de phases a été observée lors de la formation de complexes interpolymères β -lactoglobuline (β -lg)/pectine faiblement ou hautement méthylée (pectine LM ou HM). Cette séparation de phases a été caractérisée par la diffusion statique de la lumière aux petits angles lors de la formation des complexes sous l'action acidifiante de la glucono- δ -lactone (GDL). L'absence d'un vecteur d'onde maximal (q_{\max}) et la décroissance monotone de l'intensité de la lumière diffusée ($I(q)$) avec une augmentation du vecteur d'onde (q) ont été associés avec un mécanisme de déstabilisation par nucléation et croissance. La formation de complexes solubles a été initiée à des pH_c de 6,4 et de 5,0 avec la pectine faiblement ou hautement méthylée (LM ou HM), respectivement. Une augmentation de $I(q)$ aux valeurs de q intermédiaires a démontré une organisation locale des complexes résultant de la formation d'une grande quantité de petits complexes. Cette formation de petits complexes ainsi qu'une sédimentation des complexes interpolymères insolubles expliquent la diminution du diamètre moyen et de la dimension fractale des complexes β -lg/pectine LM. La structure des complexes lors de l'acidification a été confirmée par microscopie en contraste de phases.

5.2 ABSTRACT

Interpolymer complexation between β -lactoglobulin (β -lg) and pectin led to phase separation. Static light scattering was used to monitor the phase separation of β -lg/low-methoxyl or high-methoxyl-pectin (LM- or HM-pectin) mixtures as they were slowly acidified from pH 7 to 4 with glucono- δ -lactone (GDL). The absence of a scattering angle peak (q_{\max}) and the monotonic decrease in light scattered intensity with the wave vector were associated with a nucleation and growth phase separation mechanism. The formation of intrapolymer complexes was initiated at pH 6.4 with the LM-pectin and at pH 5.0 with the HM-pectin. Local ordering with increasing amounts of small complexes was observed as scattered light intensity was increased at intermediate q values. The formation of large amounts of small complexes and sedimentation would be responsible for the decrease in the number mean diameter and fractal dimension of β -lg/LM-pectin over time. The structure of complexes as solutions were acidified were observed with phase contrast microscopy.

5.3 INTRODUCTION

Polymer interactions are used in a variety of fields (i.e., medical, biochemical, food science, and polymer chemistry). Interactions between oppositely charged proteins and polysaccharides are of interest in food science, especially with respect to functional foods. The nature of interactions, whether repulsive or attractive, will lead to different behavior and properties. Attractive interactions are mainly involved in the complexation or coacervation process. Such molecular assembly is initiated as electrostatic interactions induce a molecular aggregate called intrapolymer complex whose diameter is approximately equivalent to the larger interacting molecule (Tsuboi et al., 1996). The formation of intrapolymer complexes is believed to be initiated at a critical pH called the pH_c (Wen and Dubin, 1997; Mattison et al., 1998). As intrapolymer complexes are sufficiently neutralized, they aggregate to form interpolymer complexes (Tainaka, 1979, 1980). Interpolymer complexes are formed at a second critical pH known as the pH_ϕ (Wen and Dubin, 1997; Mattison et al., 1998). Interpolymer complex formation is followed by a phase separation as the complexes become neutral and insoluble. Neutralization of assemblies leads to a phase separation where one phase is enriched with interpolymer complexes and the other is made up of intrapolymer complexes and the solvent.

The phase separation mechanism of many colloidal systems was investigated with static light scattering (Rouw et al., 1989; Mallamace et al., 1996; van Bruggen et al., 1999). Phase separation of a mixture can be studied with the evolution of light scattered intensity $I(q)$ as a function of the scattering angle (q). Few phase separation studies were carried out on biopolymer mixtures (Sanchez et al., 2002; Tromp et al., 1995; Tuinier et al., 2000). The phase separation follows a nucleation and growth or a spinodal decomposition destabilization mechanism. Spinodal decomposition arises when a mixture is in the unstable zone of the phase diagram. Therefore, the negative free energy leads to a spontaneous destabilization as soon as molecules are mixed (Tromp et al, 1995). The early stage of spinodal decomposition is characterized by an exponential growth of maximum light intensity scattered (I_{max}) with time, while the scattering angle peak (q_{max}) remains constant. Later in the process, q_{max} is displaced toward lower q values indicating a

coarsening of the structural domains. Finally, I_{\max} and q_{\max} are stabilized as the system reaches equilibrium.

A nucleation and growth destabilization mechanism occurs when a mixture is in the metastable zone of the phase diagram. There, an energy barrier has to be overcome before phase separation can occur. The absence of a q_{\max} value and a monotonic decrease in the light intensity scattered with q is considered as a characteristic of a nucleation and growth mechanism (Sanchez et al., 2002). However, such a destabilizing mechanism can occur with the occurrence of a q_{\max} value. This situation is expected at low concentrations as a depletion layer is formed around the particles, and at high concentrations, due to the correlation produced by the location of individual scatterers in a constrained space (Elicabe et al., 1997, 1998). In the later stages, q_{\max} can be displaced toward higher or lower q values depending on the evolution of the structural domains.

Using isothermal titration calorimetric, we recently showed that complexation between β -lg and pectin (at pH 4) involves two steps with different enthalpic/entropic contributions (Girard et al., 2003: Chapter 4). In the present study, light scattering was used to provide information on the β -lg and pectin complexation process, including the two steps previously identified with microcalorimetry. Glucono- δ -lactone (GDL) was used as an acidifying agent to study complex formation throughout a slow acidification process. Phase contrast microscopic observations were performed to validate the structural information obtained using static light scattering data.

β -lactoglobulin (β -lg) was chosen because of its well-known structure (Sawyer et al., 1999). This globular protein has a molecular weight of 18,350 Da and a hydrophobic core. β -lg is monomeric at acidic pH (below 3) or alkaline pH (above 8), dimeric at neutral pH, and found in both states between pH 4 and 6 (Taulier and Chalikian, 2001). The presence of the octameric form around pH 4.5 (Pessen et al., 1985) is however challenged (McKenzie and Sawyer, 1967; Taulier and Chalikian, 2001). Pectin is a cell-wall anionic polysaccharide, generally extracted from apple pomace or citrus fruits. The pectin backbone has smooth regions made up of a chain of D-galacturonic residues (D-galA). In

the hairy regions, the main chain of D-galA is interrupted with rhamnose residues, where branching of neutral sugar chains can occur.

5.4 MATERIALS AND METHODS

5.4.1 Materials

Bovine β -lg AB (3X crystallized) was purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, On, Canada) as 95% pure protein. Low-methoxyl pectin (DE 28.3%, apparent molecular weight 94.3 kDa) and high-methoxyl pectin (DE 73.4%, apparent molecular weight 118 kDa) were donated by Hercules Copenhagen A/S (Copenhagen, Denmark). All reagents were of analytical grade and used as received.

5.4.2 Preparation of solutions

β -lg, low- or high-methoxyl pectin (LM- or HM-pectin) were dialyzed against deionized water for 72 hours at 4°C. The concentration of dialyzed β -lg was determined using the bicinchoninic acid protein assay (Smith et al., 1985). The LM- and HM-pectin concentrations were assayed using the phenol-sulfuric acid method (Dubois et al., 1956). The β -lg solution was mixed with the LM- or the HM-pectin at 2:1 and 5:1 weight ratios. The total solid contents were 0.5 and 0.1% (w/w) for the microscopic observation and light scattering experiments, respectively. The pH of the solutions was adjusted to 7 with 0.1 or 0.01 N NaOH. Solutions of β -lg, LM- and HM-pectin were filtrated through a 0.22- μ m microfilter (Millipore, Bedford, MA) before microscopic and light scattering experiments.

5.4.3 Optical microscopy

Solutions of β -lg and β -lg/LM- or HM-pectin mixtures were acidified from pH 7 to 4 with HCl 0.1 N. At each 0.1 pH unit, solutions were left standing for 15 minutes and then micrographed. Solutions were observed using the phase-contrast Olympus microscope at X40 magnification (BX51 TRF model, Olympus Optical Co, Ltd, Melville NY, USA). The camera (Photometrics CoolSNAP fx, Image Processing Solutions, Inc., North Reading, MA, USA) mounted on the microscope was used to micrograph solutions in order to follow the phase separation once β -lg/pectin complexes were formed.

5.4.4 Small angle static light scattering

The scattered light intensity as a function of scattering angles was determined with a Mastersizer 2000, equipped with a 633-nm He-Ne laser source (Malvern Instruments, UK). Dispersions were sonicated 2 min in the Hydro 2000 cell prior each experiment. Under a 2000 rpm-stirring, 0.04 wt% GDL was added to dispersions to provide slow acidification. One minute later, scattered light intensity was recorded automatically every 40 s during 300 min. Acidification curve for each dispersion was obtained by recording pH values of dispersions over time. Background intensities were recorded with dispersions before GDL was added. Number and volume mean diameters, $d(0,1)$ and $d(4,3)$ respectively, were automatically calculated using the software provided with the light scattering apparatus. Scattered light intensities were recorded on a wave vector range between 9.57×10^{-3} and $3.33 \mu\text{m}^{-1}$. The refraction index of water (1.33) was used for all dispersions. Turbidity (τ) values were obtained from the following equation:

$$(29) \quad \tau = \frac{\text{Ln}\left(\frac{I_0}{I_t}\right)}{d}$$

Where d is the thickness of the cell (2.4 mm), I_0 is the incident intensity and I_t the transmitted intensity. A previous study showed that, β -lg and xanthan gum aggregated as fractals under certain conditions (Laneuville et al., 2002). The light intensity $I(q)$ scattered from fractal aggregates obeys a power law proportional to the wave vector q (Tang et al., 2000). The structure of β -lg/LM-pectin aggregates could be estimated from the slope of the scattered light intensity $I(q)$ plotted against the magnitude of the wave vector q on log-log coordinates (Teixeira, 1988; Kim and Berg, 2000). Slopes were calculated over many q values ($n = 10$). The equation 30 allows to calculate the fractal dimension (D_f) that measures the looseness of the aggregate, with a low D_f corresponding to an open structure.

$$(30) \quad I(q) \propto q^{-D_f}, \quad q = (4\pi n / \lambda) \sin(\theta / 2)$$

Where n is the refractive index of the solvent used, λ is the wavelength of the laser and θ is the scattering angle. Blank assays were carried out with separate β -lg, LM-pectin

and HM-pectin solutions. A prior study demonstrated that β -lg does not interact with LM- or HM-pectin when let at rest over night at pH 7 and at 22°C (Girard et al., 2002: Chapter 2; Girard et al., 2003: Chapter 3). Consequently, no measures were carried out for β -lg and LM- or HM-pectin mixtures without GDL. All experiments were carried out in duplicate.

5.5 RESULTS

5.5.1 Optical microscopy

Micrographs of β -lg/LM- or HM-pectin solutions at the 5:1 and 2:1 ratios and different pH values are presented in Figure 5.1. Increasing protein/pectin ratios and decreasing the pH of the solutions led to higher amounts of sharpened structures. β -lg and LM-pectin formed larger heterogeneous structures at higher pH values (Figure 5.1a and b) than with HM-pectin (Figure 5.1c and d). β -lg/LM-pectin structures at 5:1 and 2:1 ratios were visible at pH 5.1 and 5.2, respectively (not shown). β -lg/HM-pectin structures at 5:1 and 2:1 ratios were visible at pH 4.8 and 4.4 (not shown). Acidified β -lg, LM-pectin and HM-pectin solutions did not form any apparent structures at X40 magnification. Static light scattering was also used to follow the phase separation mechanism and the evolution of heterogeneous structures observed with phase contrast microscopy.

5.5.2 Small angle static light scattering

The turbidity of a solution is proportional to the amount, size and optical properties of light scattering components it contains. GDL slowly acidified solutions and led to the aggregation of β -lg and pectin. Turbidity measurements of solutions were recorded 1 min following the addition of GDL, which corresponded to $t=0$ min. Turbidity of β -lg/LM-pectin solutions at the 5:1 and 2:1 ratios constantly increased with time (Figure 5.2a). On the insert of Figure 5.2a, turbidity values are shown for the first 80 minutes of the analysis. β -lg/LM-pectin aggregates at the 5:1 and 2:1 ratios were formed 1 min after GDL was added corresponding to 6.40 and 6.45 pH values on the acidification curve (Figure 5.2b). These pH values are not significantly different and would correspond to the initial pH of

(soluble) intrapolymer complex formation (pH_c). The β -lg/LM-pectin solutions at the 5:1 and 2:1 ratios, had a second increase in turbidity, noticed at 45 and 185 min, which corresponds to the 5.00 and 4.10 pH_ϕ values, respectively. These pH_ϕ values would correspond to the phase separation occurring when insoluble complexes are formed and are in good agreement with micrographs presented above (Figure 5.1).

The turbidity of the β -lg/HM-pectin solution at the 5:1 ratio was higher than what was observed with LM-pectin. The β -lg/HM-pectin solution at the ratio 5:1 had a turbidity pattern with a great increase in turbidity followed by a sharp decrease. This particular behavior could be related to the fast acidification of the solution (Figure 5.2b). Despite this high turbidity, a 21-min-induction time was required before the first increase in turbidity was detected at a pH_c value of 5.12. Higher rates of turbidity increase of the β -lg/HM-pectin at the 5:1 ratio were noticed at 56, 64, and 68 min (4.35, 4.30, and 4.20 pH values). The phase separation associated with the pH_ϕ value occurred between pH 4.35 and 4.20. A maximum turbidity value was reached between 76 and 84 min (pH 4.10), followed by a sharp decrease, where the solution reached half its maximal turbidity value. As observed with LM-pectin, turbidity of the β -lg/HM-pectin solution was higher at the 5:1 than at the 2:1 ratio. These results are in agreement with micrographs (Figure 5.1). Contrary to what was observed at the 5:1 ratio, the β -lg/HM-pectin solution at the 2:1 ratio was less turbid than the β -lg/LM-pectin at the 2:1 ratio. Turbidity of the β -lg/HM-pectin solution at the 2:1 ratio increased after 28 min, corresponding to a pH_c value of 5.05, which is not different from the value at the 5:1 ratio. At this ratio, no further increase in turbidity associated with a pH_ϕ value was noticed. Contrary to β -lg/LM-pectin solutions, turbidity of the β -lg/HM-pectin solutions reached stability before the end of the analysis.

The number mean diameter, $d(0,1)$, of the β -lg/LM-pectin solution at 5:1 decreased from 16 to 1.5 μm between 0 and 100 min (Figure 5.3a). This result shows that β -lg and LM-pectin aggregates are found at the very beginning of the analysis. The constant number mean diameter between 60 and 80 min corresponds to the second increase in turbidity (Figure 5.2a). This period was preceded and followed by a sharp decrease in aggregates number mean diameter. At the 2:1 ratio, the number mean diameter of β -lg/LM-pectin

aggregates $d(1,0)$ was decreased from 16 to 3.4 μm . The abrupt decrease in diameter around 190 min corresponds to the second turbidity increase in the solution (Figure 5.2a). The number mean diameter of β -lg/HM-pectin at the 5:1 and 2:1 ratios measured before 50 min is probably inaccurate, because the lack of turbidity resulted in large residual values (>1). From 50 to 300 min, the number mean diameter at the 5:1 ratio increased from 0.5 to 3.5. Number mean diameter of the 2:1 ratio decreased slowly to 0.5 μm . At both ratios, the volume mean diameter $d(4,3)$ decreased over time at a rate similar to one observed for the number mean diameter (Figure 5.3b).

Small angle light scattering was used to follow the structural evolution of β -lg/LM-pectin solutions. Since the β -lg/LM-pectin solution at the 5:1 and the 2:1 ratios had a monotonic decrease of $I(q)$ with q , no I_{max} and q_{max} values were noticed (Figure 5.4). From 50 min and in the 5:1 and the 2:1 ratios, $I(q)$ increased at intermediate q values while a decrease at low q values was noticed (Figure 5.4). The β -lg/HM-solution at the 5:1 and the 2:1 ratios had no q_{max} value. In the 5:1 ratio, $I(q)$ increased at low and intermediate q values between 50 and 100 minutes and was subsequently stabilized (Figure 5.5). In the 2:1 ratio, $I(q)$ increased at intermediate q values all over the analysis. Contrary to what was observed in the β -lg/LM-pectin solutions, the β -lg/HM-pectin solutions at 5:1 and 2:1 ratios did not show a decrease in $I(q)$ at low q values.

The slope of the plot of $I(q)$ against high q values in log-log coordinates was used to determine the fractal dimension (D_f) of the solution as a function of time (Figure 5.6). From 0 to 50 minutes, the β -lg/LM-pectin at the 5:1 ratio had a stable D_f of 2.45. Between 50 and 150 min, D_f decreased to 1.72 and remained steady thereafter. At the 2:1 ratio, D_f was 2.45 between 0 and 50 min and was likely to decrease insignificantly between 50 and 150 min. Between 0 and 50 min, D_f values of the β -lg/LM-pectin aggregates were larger than that of the β -lg/HM-pectin aggregates. The slope of the β -lg/HM-pectin solution at 5:1 ratio had a constant value of 1.15 between 0 and 50 min. This low value cannot be associated with fractal structures. From 50 min, this slope increased continuously and reached 1.90 at 300 min, a value that can be considered as a fractal dimension. The 2:1 ratio had a constant slope value of 1.55 between 15 and 50 min, which gradually decreased to 1.07. These values were too small and could not be considered as true fractal dimensions.

5.6 DISCUSSION

The β -lg/LM-pectin solution at the 5:1 and 2:1 ratios had a monotonic decrease in the scattered light intensity $I(q)$ with the wave vector q , which is characteristic of a nucleation and growth phase separation mechanism (Eliçabe et al., 1998). The nucleation phase would involve the formation of intrapolymer complexes and small aggregates with fractal structures. Fractal structures were observed with the β -lg/xanthan gum system (Laneuville et al., 2002). The β -lg/acacia gum system under specific conditions showed spherical particles (Sanchez et al., 2002). These different behaviors can be probably related to the stiffness of polysaccharides. The stiffness of the xanthan gum is the highest with a persistence length around 417 nm in pure water (Camesano and Wilkinson, 2001). Pectin is also a relatively stiff molecule with a persistence length around 126 nm (Cros et al., 1996). The formation of vesicles with the acacia gum could be attributed to its flexibility with a low persistence length around 5 nm (Sanchez, 2003).

The formation of intrapolymer complexes was initiated at pH_c (i.e., 6.4) which value corresponds to a structural change observed by light scattering measurements (Xia and Dubin, 1993; Wen and Dubin, 1997; Mattison et al, 1998). This pH_c value, which is largely above the β -lg IEP (5.1), is partially explained by local positive patches on the protein. These positive patches could be localized on 1-14, 41-60, 76-83 and 132-148 peptides β -lg as demonstrated earlier (Girard et al., 2003: Chapter 3). Moreover, hydrogen bonding could be involved in the complexation between β -lg and pectin (Girard et al., 2002: Chapter 2). The pH_c value measured with light scattering was higher than the pH_c value (6.1) previously obtained with potentiometric titration (Girard et al., 2002: Chapter 2). The dialysis step prior to the light scattering measurements lowered the ionic strength of the solutions. Consequently, β -lg and pectin molecules were highly charged, resulting in a higher pH_c (Wen and Dubin, 1997). The pH_c is ratio independent because intrapolymer complexes do not follow a mass-action law (Mattison et al., 1995). This ratio independence at the beginning of complexation is in agreement with similar turbidity values measured for both ratios between 0 and 25 min. After 25 min, the higher turbidity measured at the 5:1 ratio results from the higher amount of aggregates due to the larger number of positively charged β -lg available to neutralize pectin negative charges.

The fact that the diameters and the D_f decreased and the turbidity increased between 0 and 45 min is indicative of the formation of a substantial amount of equal-size complexes or small aggregates. The formation of such assemblies corresponds to the induction time following the nucleation phase, where nuclei have to reach a critical size. This induction time was previously observed with small aggregates that had to reach a critical neutralization before they aggregate into larger interpolymer complexes (Tsuboi et al., 1996). Balsara et al. (1996) demonstrated that polyolefin clusters formed at the end of the early stage of nucleation have the characteristics of critical nuclei as the phase separation kinetics increased dramatically after their formation.

The second increase in turbidity of the β -lg/LM-pectin solution at the 5:1 ratio may result from a phase separation that transiently increases turbidity (Sanchez et al., 2002). The phase separation arising around 45 min, which corresponded to a pH_ϕ value of 5.00, is associated with the aggregation of intrapolymer complexes called the growth phase. β -lg/LM-pectin intrapolymer complexes at the 2:1 ratio are believed to aggregate after 185 min when the pH_ϕ value is 4.10. This pH_ϕ value is much lower than the pH_ϕ of 5.00 obtained for the 5:1 ratio. In fact, the pH_ϕ was expected to decrease with lower protein/pectin ratios, because of the fewer positive charges from β -lg that are available to neutralize the higher amount of pectin negative charges (Mattison et al., 1995). This result was also observed on micrographs where the 2:1 ratio had a lower amount of aggregated structures than the 5:1 ratio. The two steps involved in the complexation, known as the intrapolymer and interpolymer complex formation, were previously shown with isothermal titration calorimetry for the same β -lg/LM-pectin system at pH 4 (Girard et al., 2003: Chapter 4).

During the growth phase, the number and volume mean diameters and fractal dimensions of the β -lg/LM-pectin aggregates at the 2:1 and the 5:1 ratios decreased with acidification. The number and volume mean diameters and D_f decreased more slowly and to a lesser extent in the 2:1 ratio than in the 5:1 ratio. This is explained by the lower formation of small assemblies at the 2:1 ratio than at the 5:1 ratio because of the fewer β -lg molecules available to interact with the pectin. The higher number mean diameter at the 2:1 ratio compared to that at the 5:1 ratio can be explained by a bridging phenomenon resulting

from the non-saturation of pectin negative charges with β -lg molecules (Wangsakan et al., 2001). These diameter and D_f decreases may be explained by the formation of small assemblies, the increasing insoluble interpolymer complexes sedimentation, and/or a multiple scattering phenomenon resulting from the great obscuration with the acidification of the solution. The formation of a higher amount of small assemblies is a realistic hypothesis supported by a nucleation and growth mechanism. The increase in the amount of aggregates with lower pH values is in agreement with micrographs presented earlier. Moreover, the shoulder observed at $t = 50$ min with $I(q)$ increasing at intermediate q values is consequential to the increase in the amounts of complexes and aggregates with lower pH values. Given that the fractal dimension is affected by the system equilibrium, an increase in the amount of small assemblies could lead to a decrease in the slope of $I(q)$ in function of q in log-log coordinates, and consequently in the D_f value over time. The decrease of the D_f value after 50 min can also be explained by the intrapolymer complexes having a more compact structure than the interpolymer complexes. The turbidity values are still increasing at the end of the analysis for both ratios and indicate that the interaction between β -lg and LM-pectin was not at equilibrium. The ongoing nucleation process broadens size distribution and decreases its mean value, while the total number of particles increases (Moschiar et al., 1991). Sedimentation could also explain the lowering of the volume mean diameter, the lowering of $I(q)$ at low q values, and the difference with isothermal titration calorimetry results, which showed a higher binding stoichiometry in interpolymer complexes (Girard et al, 2003: Chapter 4). The vertical shifting of $I(q)$ plotted against q curves was observed with aggregated hematite and attributed to sedimentation (Bushell and Amal, 2000). The existence of a multiple scattering phenomenon for the 2:1 ratio is unlikely since the turbidity of the solution was relatively low.

The β -lg/HM-pectin solutions at the 5:1 and 2:1 ratios exhibited a monotonic decrease in $I(q)$ with the wave vector. Consequently, the structuring of the β -lg/HM-pectin solution likely occurred through a nucleation and growth mechanism. According to turbidity measurements and microscopic observations, intrapolymer and interpolymer complexes are more slowly formed with HM-pectin than with LM-pectin. The difference between the pH_c values of intrapolymer complexes containing LM- or HM-pectin is

attributed to the difference in the polysaccharide charge density (Park et al., 1992). The first signs of turbidity in the β -lg/HM-pectin solutions at the 5:1 and 2:1 ratios were observed later than with LM-pectin (i.e. at 21 and 28 min and at a pH_c of 5.1). Despite the prior dialysis step, this pH_c value obtained with HM-pectin is lower than the pH_c value of 5.5, which was determined with potentiometric titration (Girard et al., 2002: Chapter 2).

The constant D_f and number mean diameter of the β -lg/HM-pectin at the 5:1 and the 2:1 ratio, along with the increase in turbidity, are indicative of the formation of large amounts of assemblies of similar size. The high volume mean diameters observed between 0 and 50 min could be attributed to flocculation. The low values of D_f between 0 and 50 min are associated with the induction time, characteristic of a nucleation and growth mechanism, where only very small aggregated structures are formed as shown on micrographs.

β -lg/HM-pectin aggregates at 5:1 ratio, which were small at the beginning, grew over time, and became more compact with higher D_f values. The phase separation occurred around 64 min with a pH_ϕ of 4.30 as critical nuclei were formed, associated with an increase in turbidity, in number mean diameter, and in fractal dimension. The absence of pH_ϕ value at the 2:1 ratio confirms that the system is more in the nucleation phase of the process than in the growth phase. Because of the small size of aggregates at the 2:1 ratio, as shown on the micrographs, the slopes of $I(q)$ according to q in log-log coordinates could not be associated with fractal structures. The slope values around 1 obtained for the β -lg/HM-pectin solution at 5:1 and 2:1 ratios could be associated with rod-like structures. On the other hand, measurements on the β -lg/HM-pectin solution may have been carried out in the wrong window of observation. Consequently, the structure of such small structures could be more accurately determined with small angle neutron scattering. A shoulder of $I(q)$ was visible at intermediate q values for the 5:1 and 2:1 ratios indicating a local ordering of increasing complex and aggregate amounts. Since $I(q)$ plotted against q curves did not decrease with time at low q values, sedimentation is believed to be of less importance than with LM-pectin.

5.7 CONCLUSION

Small angle static light scattering revealed that acidification-induced complexation between β -lg and pectin follows a nucleation and growth mechanism. Also, it was shown that complexation is a two-step process involving the formation of intrapolymer and interpolymer complexes. Complexes obtained through acidification of β -lg/LM-pectin solutions had fractal structures. According to the evolution of the D_f value, intrapolymer complexes have a more compact structure than interpolymer complexes. The β -lg/HM-pectin complexes could be associated with rod-like structures. Such small structures could be studied with small angle neutron scattering. Acidification of solutions increased the amounts of small assemblies leading to a structuration of the systems. Phase contrast microscopy confirmed the results obtained from light scattering measurements. This study allows a better understanding of protein/polysaccharide acidified solutions and could be used to improve the β -lg/pectin complexes production as microencapsulation devices. Further studies are needed to verify the impact of the GDL used as an acidifying agent to induce the complexation of β -lg and pectin.

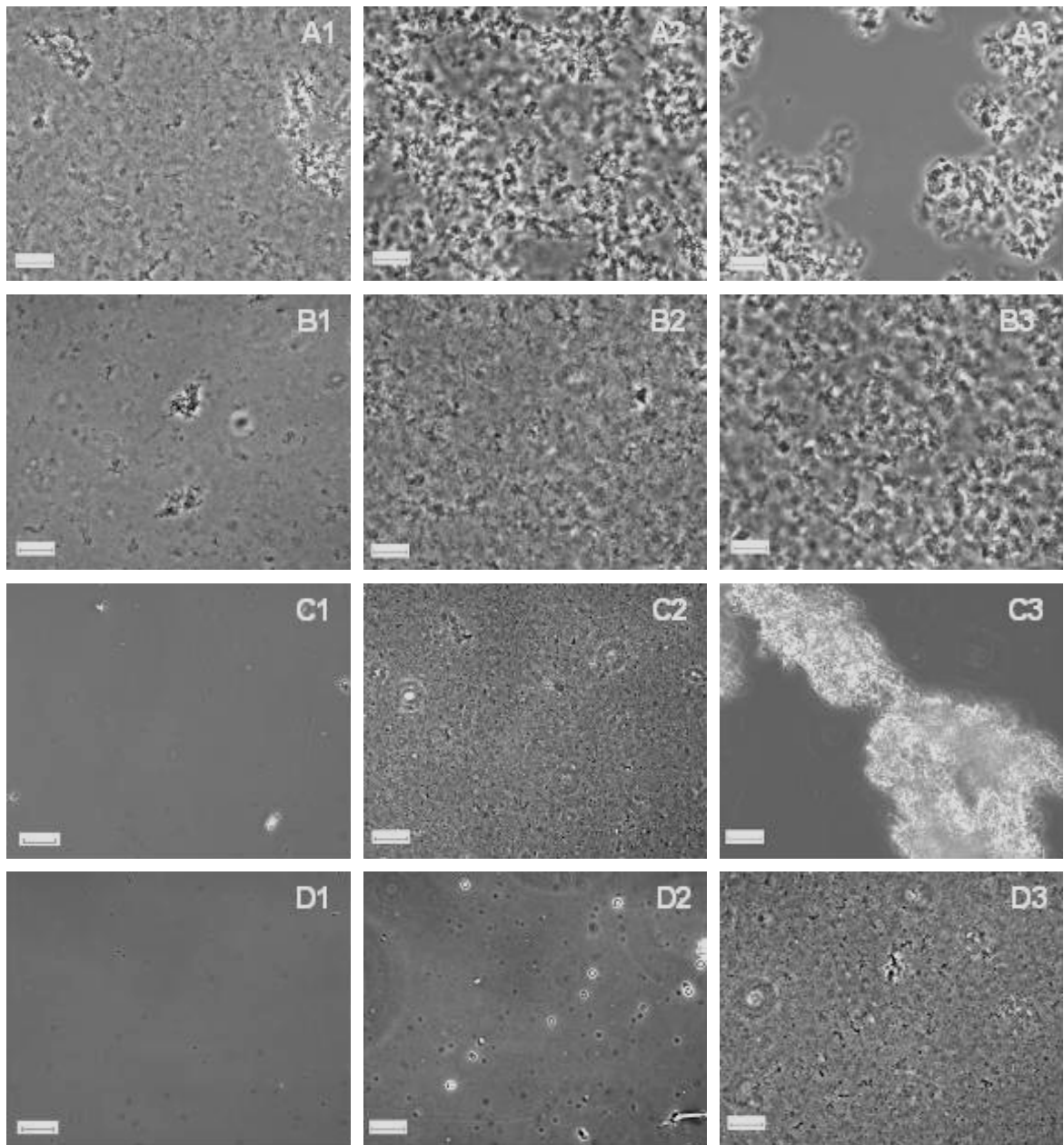


Figure 5.1 Phase contrast micrographs from β -lg/LM-pectin solutions at A) 5:1 and B) 2:1 ratios and of β -lg/HM-pectin solutions at ratios C) 5:1 and D) 2:1. Numbers 1, 2 and 3 refer to 5.0, 4.5 and 4.0 pH values, respectively. The scale bar represents 20 μ m.

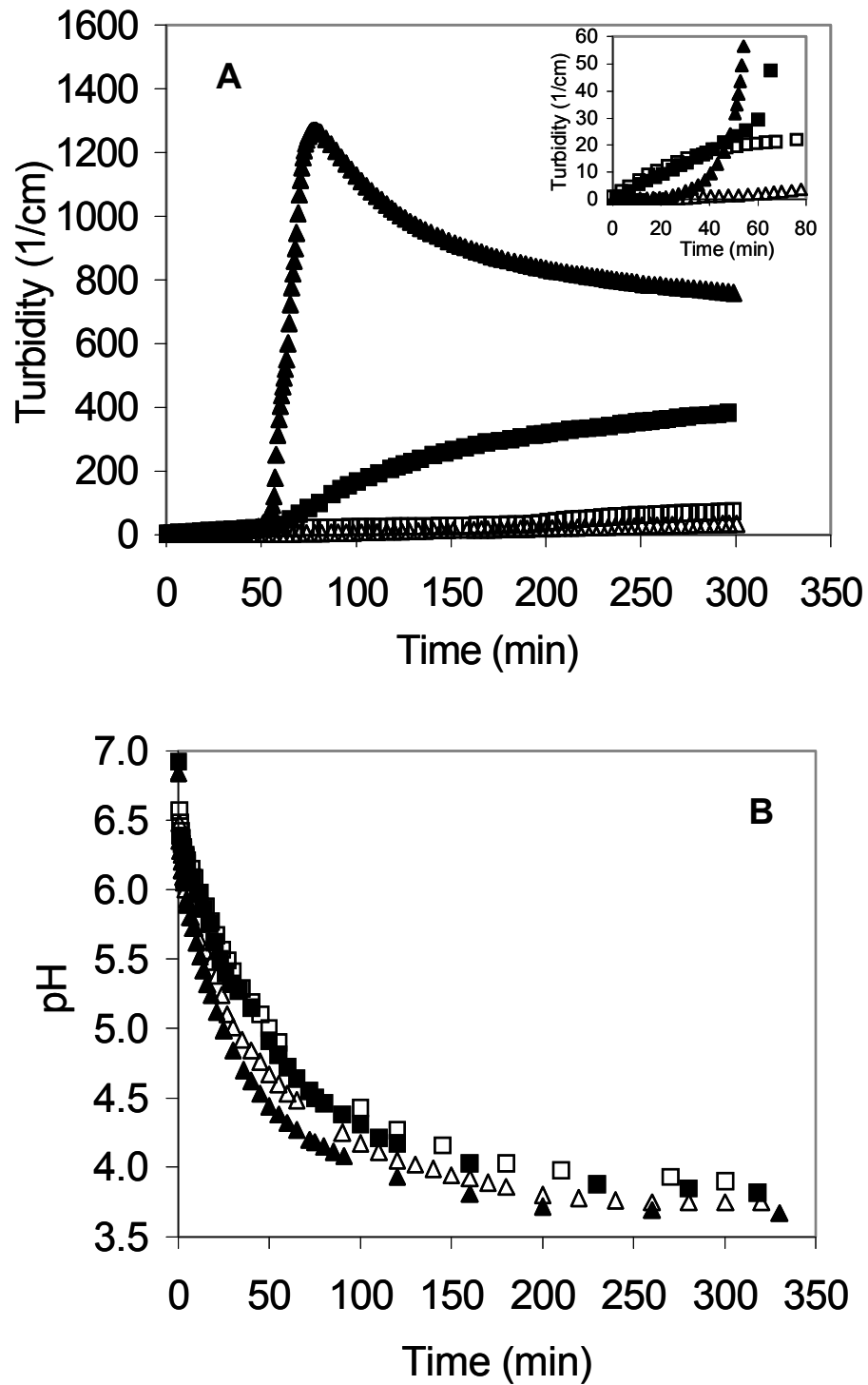


Figure 5.2 A) Evolution of turbidity with time calculated for β -lg/LM pectin solutions at 5:1 (■) and 2:1 (□) ratios and for HM-pectin solutions at 5:1 (▲) and 2:1 (△) ratios. Insert: detail of curves at the beginning of the analysis. B) Acidification curves obtained with GDL.

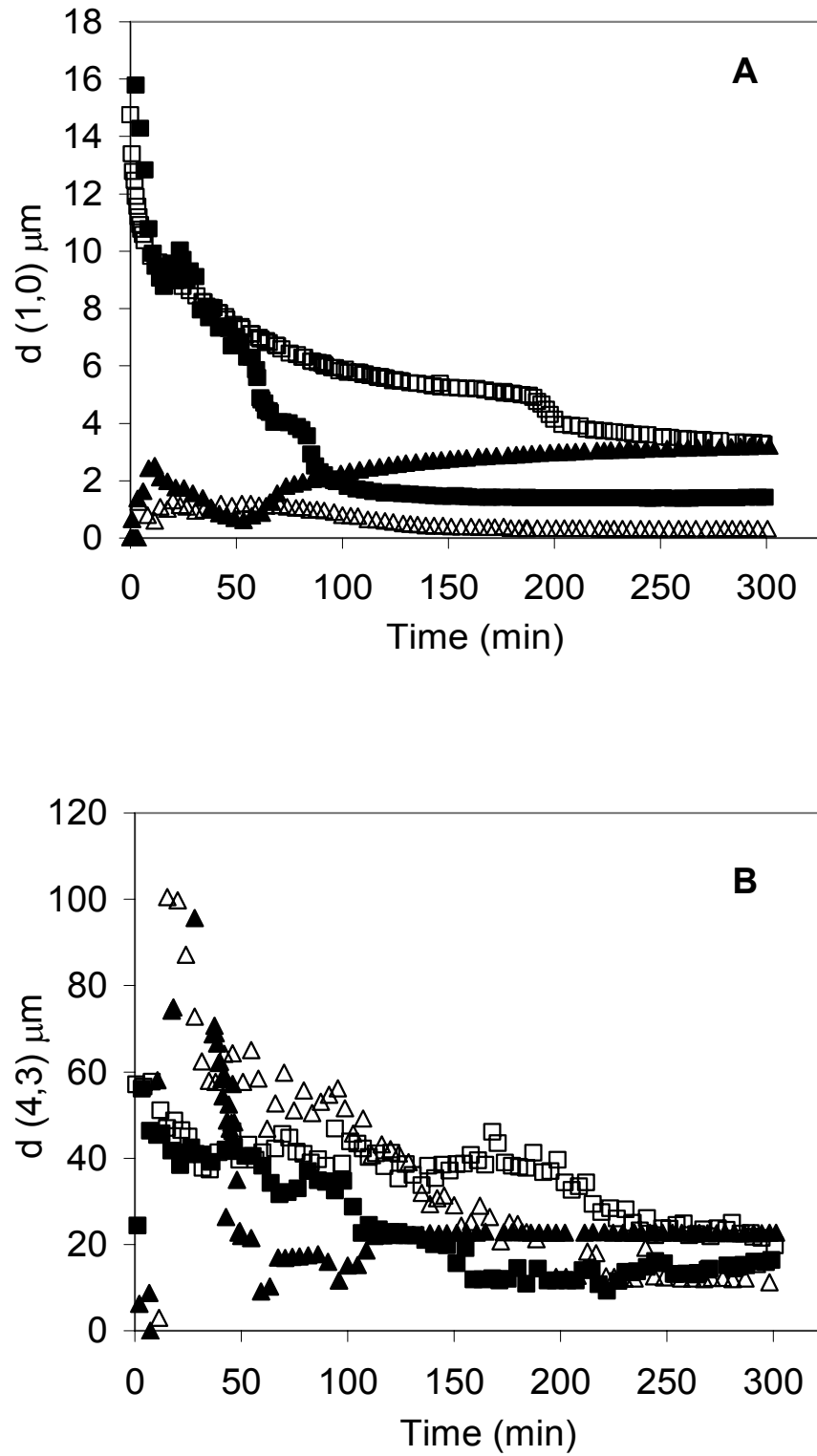


Figure 5.3 A) Number and B) volume mean diameters of β -Ig/LM solutions at 5:1 (■) and 2:1 (□) ratios and of β -Ig/HM-pectin solutions at 5:1 (▲) and 2:1 (△) ratios.

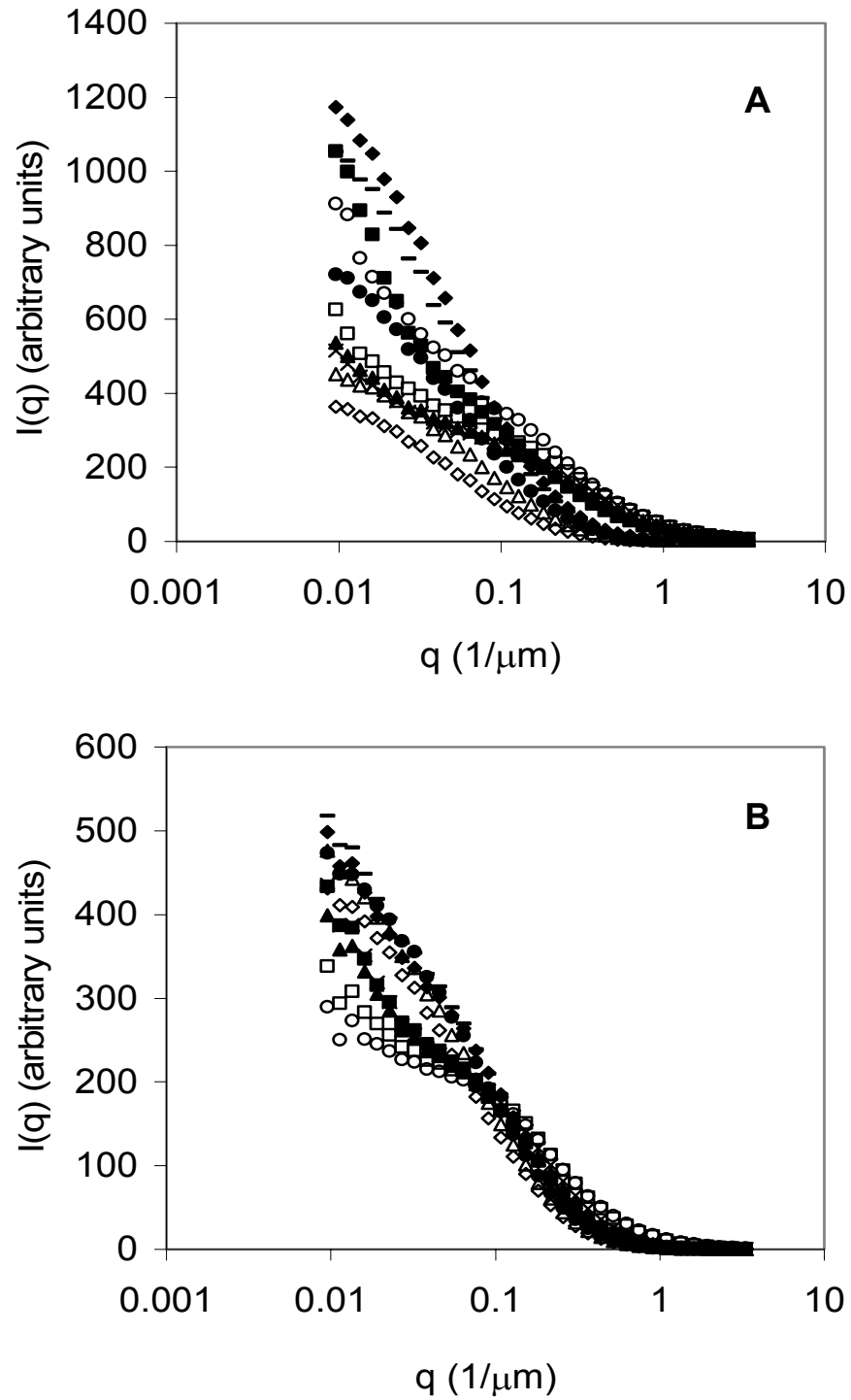


Figure 5.4 Light scattering intensity as a function of the wave vector for the β -Ig/LM-pectin solution at 10 (\diamond), 20 (\triangle), 30 (\bullet), 40 ($-$), 50 (\blacklozenge), 100 (\blacksquare), 150 (\blacktriangle), 200 (\times), 250 (\square) and 300 (\circ) min for A) 5:1 and B) 2:1 ratios.

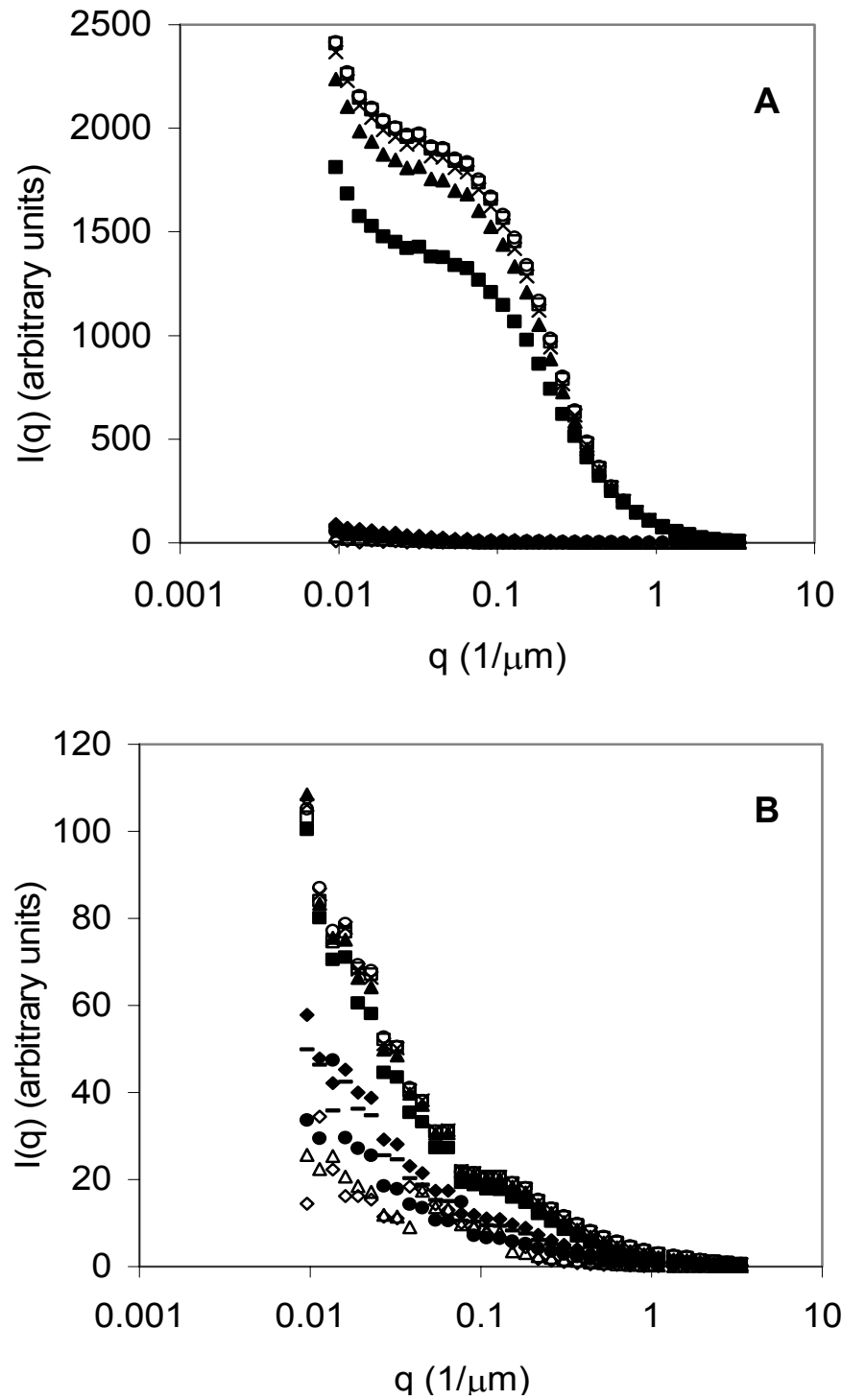


Figure 5.5 Light scattering intensity as a function of the wave vector for the β -Ig/HM-pectin solution at 10 (\diamond), 20 (\triangle), 30 (\bullet), 40 ($-$), 50 (\blacklozenge), 100 (\blacksquare), 150 (\blacktriangle), 200 (\times), 250 (\square) and 300 (\circ) min for A) 5:1 and B) 2:1 ratios.

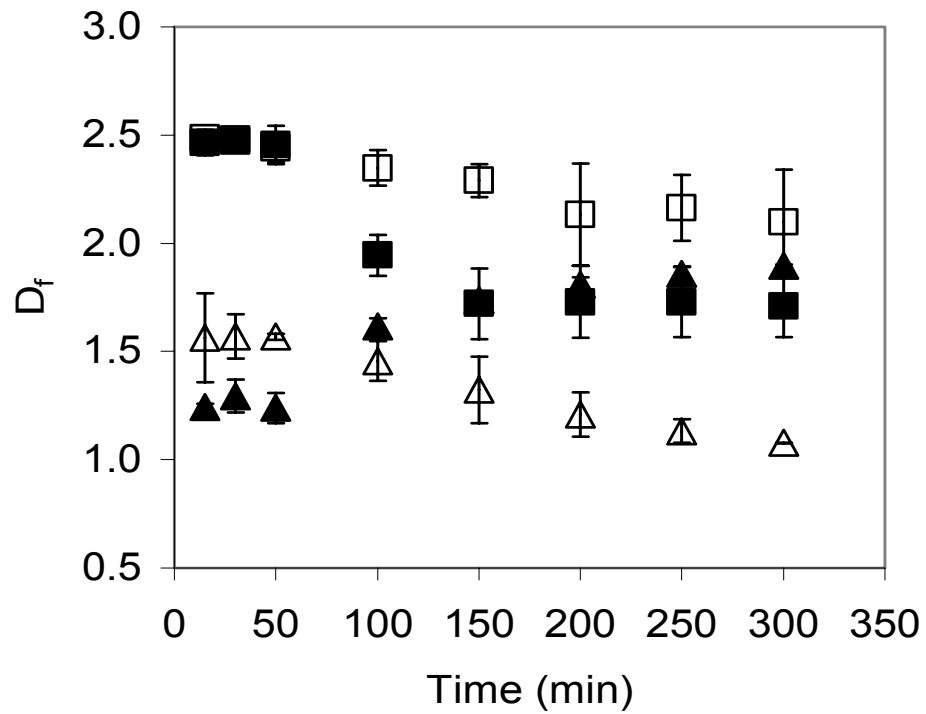


Figure 5.6 Time evolution of fractal dimensions (D_f) of β -lg/LM-pectin solution at ratios 5:1 (■) and 2:1 (□) and of β -lg/HM-pectin solution at 5:1 (▲) and 2:1 (△) ratios. Values below 1.5 are not considered as fractals.

CHAPITRE 6: Conclusion générale

L'hypothèse de travail était que l'utilisation d'un modèle β -lg/pectine hautement ou faiblement méthylée permettra de caractériser les interactions protéine/polysaccharide anionique impliquées lors d'une complexation à pH acide à différentes conditions de pH, de force ionique, et de concentration. Cette hypothèse a été vérifiée par l'utilisation du système β -lg/pectine tout au long du projet en effectuant des liens entre la nature des biopolymères utilisés et les résultats obtenus. La généralisation des résultats obtenus à d'autres systèmes nécessite la prise en compte de nombreux facteurs, décrits au chapitre 1, influençant la formation et la structure des complexes.

Le but du projet a été atteint puisque des connaissances fondamentales sur les interactions entre les protéines et les polysaccharides anioniques ont été acquises à l'aide du système modèle β -lactoglobuline/pectine en zone de compatibilité thermodynamique. L'utilisation de méthodes de caractérisation complémentaires a permis de dresser un portrait global des complexes β -lg/pectine.

Les pH de formation des complexes solubles (pH_c) entre la β -lg et la pectine LM ou HM ont été déterminés par titrage potentiométrique. L'initiation de la formation des complexes est indépendante du ratio et diminue avec une augmentation de la force ionique ou du DE de la pectine. La dissociation des complexes en présence de chlorure de sodium, d'urée ou lors d'une augmentation de température a démontré que les interactions maintenant les complexes β -lg/pectine LM ou HM sont majoritairement de nature électrostatique et en partie due à des liens hydrogène. Les complexes β -lg/pectine HM ont une proportion de liens hydrogène plus importante que les complexes avec la pectine LM.

La constante d'association, la stoechiométrie, la taille du site de liaison et la coopérativité des complexes β -lg/pectine LM ou HM ont été déterminés par l'analyse frontale continue en électrophorèse capillaire (FACCE) et le modèle des sites d'interaction superposés. Les complexes formés avec la pectine LM ont démontré une coopérativité qui n'a pas été observée avec la pectine HM. L'espace occupé par une molécule de β -lg est d'environ 15 résidus D-galA à pH 4 et 6, alors qu'elle augmente à environ 50 résidus à l'approche du point isoélectrique de la β -lg. L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à

maintenant démontre que l'interaction entre la β -lg et la pectine diminue avec une augmentation du pH, de la force ionique, de la température et du DE de la pectine. Les peptides β -lg 132-148, 76-83, 41-60 et 1-14 sont potentiellement impliqués lors de l'interaction avec la pectine en occupant un espace sur la pectine comparable à celui de la β -lg. La présence de plus d'une zone réactive en surface de la β -lg lui permettrait de se lier à plus d'une molécule de pectine.

Le titrage calorimétrique isothermique (ITC) a permis d'obtenir la constante d'association, la stoechiométrie, l'enthalpie et l'entropie des complexes β -lg/pectine LM ou HM à pH 4. Ainsi, la validation des résultats obtenus en électrophorèse capillaire a pu être effectuée. Les résultats ont démontré que la complexation entre la β -lg et la pectine s'effectue en deux étapes, correspondant à la formation de complexes intrapolymères solubles suivie par leur agrégation en complexes interpolymères insolubles. La complexation entre la β -lg et la pectine est spontanée lors de la formation des complexes solubles et insolubles. La formation des complexes solubles est conduite par l'enthalpie favorable alors que l'agrégation en complexes insolubles est le résultat de facteurs enthalpique et entropique favorables. La première étape est peu influencée par le DE de la pectine puisqu'à part la stoechiométrie, aucun des paramètres n'est significativement différent. Lors de la deuxième étape, les complexes β -lg/pectine LM ont une stoechiométrie, une constante d'association et une enthalpie dégagée plus élevées. Les valeurs négatives d'enthalpie mesurées en ITC pourraient s'expliquer, en partie, par des changements conformationnels de la pectine et de la β -lg lors de l'interaction.

Le suivi de l'évolution des complexes sous l'action acidifiante de la glucono- δ -lactone (GDL) par diffusion statique de la lumière a confirmé les deux étapes de formation des complexes qui avaient été observées par ITC. La nucléation et croissance est le mécanisme de déstabilisation rencontré lors de la séparation de phase induite par la complexation. Une augmentation de la quantité des complexes tout au long de l'acidification donne lieu à une certaine organisation locale des systèmes. En accord avec les mesures par titrage potentiométrique, la formation des complexes solubles est indépendante du ratio. Cependant, un ratio plus élevé augmente la quantité de complexes formés. Les complexes formés avec la pectine LM ont été obtenus en début d'acidification,

alors que ceux avec la pectine HM ont nécessité une acidification plus poussée. La sédimentation des complexes contenant la pectine LM était plus importante qu'avec la pectine HM démontrant la meilleure solubilité de ces derniers complexes. La microscopie en contraste de phases a permis de visualiser la formation des complexes β -lg/pectine LM ou pectine HM à différents ratios et pH, et de confirmer les résultats obtenus par diffusion statique de la lumière.

En plus des résultats obtenus, le projet a permis de mettre en lumière l'utilisation de techniques inhabituelles en sciences alimentaires. L'électrophorèse capillaire et le titrage isothermique calorimétrique sont des techniques qui pourront être appliquées à d'autres études d'interactions impliquant des molécules de poids moléculaires hétérogènes. L'électrophorèse capillaire est un outil performant dans les conditions utilisées lorsque les complexes formés sont de grandes tailles, les interactions fortes et lorsque le polysaccharide porte une charge négative. Lorsque ces conditions ne sont pas rencontrées, l'utilisation de l'ultrafiltration, malgré l'effet d'exclusion de Donnan, est une alternative mieux adaptée. Ces techniques sont toutefois assez longues puisque l'élaboration d'un isotherme d'interactions nécessite autant d'analyses qu'il y a de points. Selon moi, le titrage isothermique calorimétrique est la technique la plus intéressante pour l'étude d'interactions moléculaires. Cette technique est très rapide et présente un grand potentiel d'application pour les interactions de toutes sortes. Le principal désavantage de cette technique est la grande quantité de matériel nécessaire à sa réalisation. Cependant, ce facteur est souvent peu limitant en sciences alimentaires. L'utilisation de cette technique requiert une bonne connaissance des phénomènes qui, en plus de l'interaction, peuvent induire un dégagement ou une absorption d'énergie dans le système à l'étude. En générale, la validité de ce travail repose sur l'utilisation de multiples techniques permettant de vérifier d'une manière rigoureuse la majorité des résultats obtenus. La faiblesse de cette étude est de ne pas tenir compte de la distribution du poids moléculaire de la pectine et de la structure quaternaire de la β -lactoglobuline lors du calcul de paramètres quantitatifs. Par conséquent, l'ensemble des résultats obtenus permet de caractériser le système β -lg/pectine en solution de façon semi-quantitative.

Les résultats présentés dans cette thèse pourront être complétés par l'étude de l'effet de la complexation β -lg/pectine sur l'équilibre dimère/monomère de la β -lg et sur la structure des deux macromolécules. L'influence de la nature de l'acidifiant sur le mécanisme de formation et la structure des complexes pourra aussi être investiguée. Les résultats peuvent aussi être exploités dans des projets plus appliqués portant, par exemple, sur l'élaboration de complexes protéine/polysaccharide en tant qu'ingrédient alimentaire. La grande fragilité des complexes semble être le principal obstacle à surmonter. La comparaison entre les résultats obtenus en milieu dilué et le comportement des protéines et polysaccharides en système concentré ou gélifié serait aussi une voie intéressante.

Bibliographie

- Ambjerg Pedersen, H.C.; Jørgensen, B.B. Influence of pectin on the stability of casein solutions studied in dependence of varying pH and salt concentration. *Food Hydrocoll.* **1991**, *5*, 323-328.
- Antonov, Y.A.; Lashko, N.P.; Golotova, T.; Malovikova, A.; Markovich, O. Effect of structural features of pectins and alginates on their thermodynamic compatibility with gelatin in aqueous media. *Food Hydrocoll.* **1996**, *10*, 1-9.
- Antonov, Y.A.; Soshinsky, A.A. Interactions and compatibility of ribuloso-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from alfalfa with pectin in aqueous medium. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *27*, 279-285.
- Aymard, P.; Durand, D.; Nicolai, T. The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *19*, 213-221.
- Axelos, M.A.V.; Thibault, J.-F. Influence of the Substituents of the Carboxyl Groups and of the Rhamnose Content on the Solution Properties and Flexibility of Pectins. *Int. J. Biol. Macromol.* **1991**, *13*, 77-82.
- Azegami, S.; Tsuboi, A.; Izumi, T.; Hirata, M.; Dubin, P.L.; Wang, B.; Kokufuta, E. Formation of an intrapolymer complex from human serum albumin and poly(ethylene glycol). *Langmuir* **1999**, *15*, 940-947.
- Balsara, N.P.; Lin, C.; Hammouda, B. Early stages of nucleation and growth in a polymer blend. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3847-3850.
- Barker, J.A. Lattice theories of the liquid state, Pergamon Press: Oxford, **1963**, 133 pp.
- Beaulieu, M.; Turgeon, S.L.; Doublier, J.-L. Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *Int. Dairy J.* **2001**, *11*, 961-967.
- Braudo, E.E.; Antonov, Y.A. Non-coulombic complex formation of protein as a structure forming factor in food systems. In *Food proteins, structure and functionality*, Schwenke, VCH:Weinheim, **1993**, pp 210-215.

- Brynda, M.; Chodanowski, P.; Stoll, S. Polyelectrolyte-particle complex formation. Polyelectrolyte linear charge density and ionic concentration effects. Monte Carlo simulations. *Colloid Polym. Sci.* **2002**, *280*, 789-797.
- Burgess, D.J. Practical analysis of complex coacervate systems. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *140*, 227-138.
- Burgess, D.J. Complex coacervation: micro-capsule formation. In *Macromolecular complexes in chemistry and biology*. Springer-Verlag: Berlin, **1994**, pp 285-325.
- Burton, B.A.; Brant, D.A. Comparative Flexibility, Extension and Conformation of some Simple Polysaccharide Chains. *Biopolymers* **1983**, *22*, 1769-1792.
- Bushell, G.; Amal, R. Measurement of fractal aggregates of polydisperse particles using small-angle light scattering. *J. Colloid Interf. Sci.* **2000**, *221*, 186-194.
- Camesano, T.A.; Wilkinson, K.J. Single molecule study of xanthan conformation using atomic force microscopy. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1184-1191.
- Cayot, P.; Lorient, D. Structures et technofonctions des protéines du lait, Arilait Recherches: Paris, 1998, pp 37-182.
- Chen, W.S.; Henry, G.A.; Gaud, S.M.; Miller, M.S.; Kaiser, J.M.; Balmaceda, E.A.; Morgan, R.G.; Baer, C.C.; Borwankar, R.P.; Hellgeth, L.C.; Strandholm, J.J.; Hasenhuettl, G.L.; Kerwin, P.J.; Chen, C.C.; Kratochvil, J.F.; Lloyd, W.L.; inventors : Kraft Inc., assignee. **1989**. Microfragmented ionic polysaccharide/protein complexes solutions. U.S. Patent 4,559,233.
- Chodanowski, P.; Stoll, S. Polyelectrolyte adsorption on charged particles: ionic concentration and particle size effect-A Monte Carlo approach. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 4951-4960.
- Cros, S.; Garnier, C.; Axelos, M.A.V.; Imberty, A. Solution conformations of pectin polysaccharides: Determination by small angle neutron scattering, viscometry, and molecular modeling. *Biopolymers* **1996**, *39*, 339-352.
- De Wit, J.N. Structure and functional behavior of whey proteins. *Neth. Milk Dairy J.* **1981**, *35*, 47-64.

- Dickinson, E.; Pawlowski, K. Effect of high-pressure treatment of protein on the rheology of flocculated emulsions containing protein and polysaccharide. *J Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2992-3000.
- Dickinson, E.; Galazka, V.B. Emulsion stabilisation by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocoll.* **1991**, *5*, 281-296.
- Dickinson, E.; McClement, D.J. Molecular Basis of Protein Functionality. In *Advances in Food Colloids*, Blackie Academic: London, **1996**, pp 27-76.
- Dubin, P.L.; Gao, J.; Mattison, K. Protein purification by selective phase separation with polyelectrolytes. *Sep. Purif. Methods* **1994**, *23*, 1-16.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.S.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350-356.
- Einhorn-Stoll, U.; Glasenapp, N.; Kunzek, H. Modified pectins in whey protein emulsions. *Nahrung* **1996**, *2*, s60-67.
- Eliçabe, G.E.; Larrondo, H.A.; Williams, R.J.J. Polymerization-induced phase separation: a maximum in the intensity of scattered light associated with a nucleation and growth mechanism. *Macromolecules* **1997**, *30*, 6550-6555.
- Eliçabe, G.E.; Larrondo H.A.; Williams R.J.J. Light scattering in the course of a polymerization-induced phase separation by a nucleation and growth mechanism. *Macromolecules* **1998**, *31*, 8173-8182.
- Flory, P.J. Thermodynamics of high polymer solutions. *J. Chem. Phys.* **1942**, *10*, 51-61.
- Flory, P.J. Principles of Polymer Chemistry, Cornell University Press: New York, **1953**, pp 495-593.
- Foegeding, E.A.; Kuhn, P.R.; Hardin, C.C. Specific divalent cation-induced changes during gelation of β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2092-2097.
- Fogolari, F.; Ragona, L.; Licciardi, S.; Romagnoli, S.; Michelutti, R.; Ugolini, R.; Molinari, H. Electrostatic properties of bovine β -lactoglobulin. *Proteins* **2000**, *39*, 317-330.

- Furukawa, H. Dynamic-scaling theory for phase-separating unmixing mixtures: growth rates of droplets and scaling properties of autocorrelation functions, *Physica* **1984**, *123A*, 497-515.
- Galazka, V.B.; Smith, D.; Ledward, D.A.; Dickinson, E. Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chem.* **1999**, *64*, 303-310.
- Gao, J.Y.; Dubin, P.L.; Muhoberac, B.B. Measurement of the binding of proteins to polyelectrolytes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2945-2951.
- Gao, J.Y.; Dubin, P.L.; Muhoberac, B.B. Capillary electrophoresis and dynamic light scattering studies of structures and binding characteristics of protein-polyelectrolyte complexes. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 5529-5535.
- Girard, M.; Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F. Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- or high-methoxyl pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. *Food Hydrocoll.* **2002**, *16*, 585-591.
- Girard, M.; Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F. Quantification of the interactions between β -lactoglobulin and pectin through capillary electrophoresis analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2003** in press.
- Girard, M.; Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F. Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin/pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4450-4455.
- Gurov, A.N.; Gurova, N.V.; Tolstoguzov, V.B. Estimation of emulsifying properties of proteins and their complexes with anionic polysaccharides. *Nahrung* **1986**, *30*, 424-428.
- Gurov, A.N.; Nuss, P.V. Protein-polysaccharide complexes as surfactants. *Nahrung* **1986**, *30*, 349-353.
- Gurov, A.N.; Gurova, N.V.; Leontiev, A.L.; Tolstoguzov, V.B. Equilibrium and non-equilibrium complexes between serum albumin and dextran sulfate- I. Complexing

- conditions and composition of non-equilibrium complexes. *Food Hydrocoll.* **1988**, *2*, 267-283.
- Hallberg, R.K.; Dubin, P.L. Effect of pH on the binding of β -lactoglobulin to sodium poly(styrenesulfonate). *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8629-8633.
- Harding, S.; Jumel, K.; Kelly, R.; Gudo, E.; Horton J.C.; Mitchell J.R. The structure and nature of protein-polysaccharide complexes. In *Food Protein, Structure and Functionality*, VCH: Weinheim, **1993**, pp 216-226.
- Hattori, T.; Hallberg, R.; Dubin, P.L. Roles of electrostatic interactions and polymer structure in the binding of β -lactoglobulin to anionic polyelectrolyte: measurement of binding constants by frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Langmuir* **2000**, *16*, 9738-9743.
- Hiemenz, P.C; Rajagopalan, R. Principles of colloid and surface science 3rd Edition, Marcel Dekker: New York, **1997**, 670 pp.
- Hill, R.D.; Zadow, J.G. The Precipitation of Whey Proteins by Carboxymethylcellulose of Differing Degrees of Substitution. *J. Dairy Sci.* **1974**, *41*, 373-380.
- Huggins, M.L. Theory of solutions of high polymers. *J. Am. Chem. Phys.* **1942**, *64*, 1712-1719.
- Imeson, A.P.; Ledward, D.A.; Mitchell, J.R. On the nature on the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. *J. Sci. Food Agric.* **1977**, *28*, 669-672.
- Israelachvili, J. Intermolecular and surface forces 2nd Edition, Academic Press: London, **1992**, 450 pp.
- Jeyarajah, S.; Allen, J.C. Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 80-85.
- Kaibara, K.; Okasaki, T.; Bohidar, H.B.; Dubin, P.L. pH-induced coacervation in complexes of bovine serum albumin and cationic polyelectrolytes. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 100-107.
- Kella, N.K.; Kinsella, J.E. Structural stability of β -lactoglobulin in the presence of kosmotropic salts. *Int..J. Peptide Protein Res.* **1988**, *32*, 396-405.

- Kim, A.Y.; Berg, J.C. Fractal heteroaggregation of oppositely charged colloids. *J. Colloid Interf. Sci.* **2000**, *229*, 607-614.
- Kokufuta, E. Functional immobilized biocatalysts. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17*, 647-697.
- Kontopidis, G.; Holt, C.; Sawyer, L. The ligand-binding site of bovine β -Lactoglobulin: evidence for a function? *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 1043-1055.
- Kuhn, P.R.; Foegeding, E.A. Mineral salt effects on whey protein gelation. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1013-1016.
- Laneuville, S.I.; Paquin, P.; Turgeon, S.L. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes. *Food Hydrocoll.* **2000**, *14*, 305-314.
- Laneuville, S.I.; Sanchez, C.; Turgeon S.L.; Hardy, J.; Paquin, P. Study of β -lactoglobulin/xanthan gum complexation by small angle light scattering. Annual Meeting of the American Dairy Science Association and American Society of Animal Science, Quebec city, July 21-25, **2002**.
- Le Hénaff, S. Microparticules de complexes de protéines de lactosérum et de xanthane comme substitut de matière grasse. Mémoire de maîtrise, **1996**, Université Laval, Québec.
- Ledward, D.A. Protein-Polysaccharide Interactions. In *Polysaccharides in Food*, Butterworth & Co ltd: London, **1979**, pp 205-217.
- Li, Y.; Mattison, K.; Dubin, P.L.; Havel, H.A.; Edwards, S.L. Light scattering studies of the binding of bovine serum albumin to a cationic polyelectrolyte. *Biopolymers* **1996**, *38*, 527-533.
- Mallamace, F.; Micali, N.; Trusso, S. A light scattering study of spinodal decomposition systems containing surfactant molecules. *J. Phys.: Condens. Matter* **1996**, *8*, A81-A101.
- Mattison, K.W.; Brittain, I.J.; Dubin, P.L. Protein-polyelectrolyte phase boundaries. *Biotechnol. Prog.* **1995**, *11*, 632-637.

- Mattison, K.W.; Dubin, P.L.; Brittain, I.J. Complex formation between bovine serum albumin and strong polyelectrolytes: effects of polymer charge density. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3830-3836.
- Mattison, K.; Wang, Y.; Grymonpré, K.; Dubin, P.L. Micro- and macro-phase behavior in protein-polyelectrolyte systems. *Macromol. Symp.* **1999**, *140*, 53-76.
- McGhee, J.D.; von Hippel, P.H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 469-489.
- McKenzie, H.A.; Sawyer, W.H. Effect of pH on β -lactoglobulins. *Nature* **1967**, *214*, 1101-1104.
- McKenzie, H.A.; Ralston, G.B.; Shaw, D.C. Location of sulfhydryl and disulfide groups in bovine β -lactoglobulins and effects of urea. *Biochemistry* **1972**, *11*, 4534-4547.
- Morr, C.V.; Ha, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1993**, *33*, 431-476.
- Moschiar, S.M.; Riccardi, C.C.; Williams, R.J.J.; Verchere, D.; Sautereau, H.; Pascault, J.P. Rubber-modified epoxies. 3. Analysis of experimental trends through a phase-separation model. *J. Appl. Polym. Sci.* **1991**, *42*, 717-735.
- Nakajima, A.; Sato, H. Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyvinyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution. *Biopolymers* **1972**, *10*, 1345-1355.
- Nangia-Makker, P.; Conklin, J.; Hogan, V.; Raz, A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends Molec. Med.* **2002**, *8*, 187-192.
- Ndi, E.E.; Swanson, B.G.; Barbosa-Canovas, G.V.; Luedecke L.O. Rheology and microstructure of β -lactoglobulin/sodium polypectate gels. *J. Agric. Food Chem.* **1996a**, *44*, 86-92.

- Ndi, E.E.; Swanson, B.G.; Dunker, A.K.; Luedecke, L.O. Relation of β -lactoglobulin-Sodium Polypectate to Bulk Macromolecular Concentration, *J. Food Sci.* **1996b**, *61*, 69-73.
- Noiseux, I.; Gauthier, S.F.; Turgeon, S.L. Interactions between bovine β -lactoglobulin and peptides under different physicochemical conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *50*, 1587-1592.
- O'Brien, R.; Rugman, P.; Renzoni, D.; Layton, M.; Handa, R.; Hilyard, K.; Waterfield, M.D.; Driscoll, P.C.; Ladbury, J.E. Alternative modes of binding of proteins with tandem SH2 domains. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 570-579.
- O'Brien, R.; Ladbury, J.E.; Chowdhry, B.Z. Isothermal titration calorimetry. In *A practical approach to protein-ligand interactions: Hydrodynamics and calorimetry*, IRL Press: Oxford, **2001**, pp 263-286.
- Overbeek, J.T.J.; Voorn, M.J. Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1957**, *49* (S1) 7.
- Park, J.M.; Muhoberac, B.B.; Dubin, P.L.; Xia, J. Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules* **1992**, *25*, 290-295.
- Pessen, H.; Purcell, J.M.; Farrel H.M., Jr. Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of self-associating globular protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1985**, *828*, 1-12.
- Phillips, G.O.; Williams, P.A. Interactions of hydrocolloids in food systems. In *Ingredient interactions, effects on food quality*; Marcel Dekker, Inc.: New York, **1995**, pp 131-169.
- Piculell, L.; Lindman, B. Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant and surfactant/surfactant mixtures: similarities and differences. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1992**, *41*, 149-178.

- Piculell, L.; Bergfeldt, K.; Nilsson, S. Factors determining phase behaviour of multi-component polymer systems. In *Biopolymer Mixtures*; Nottingham University Press: Nottingham, **1995**, pp 13-36.
- Prausnitz, J.M.; Lichtenthaler, R.N.; de Azevedo, E.G. Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria 3rd Edition, Prentice-Hall inc.: New Jersey, **1999**, pp 9-117, 213-453.
- Prokop, A.; Kozlov, E.; Newman, G.W.; Newman, M.J. Water-based nanoparticulate polymeric system for protein delivery: permeability control and vaccine application. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 78, 459-466.
- Qin, B.Y.; Bewley, M.C.; Creamer, L.K.; Baker, H.M.; Baker, E.N.; Jameson, G.B. Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry* **1998b**, 37, 14014-14023.
- Qin, B.Y.; Creamer, L.K.; Baker, E.D.; Jameson, G.B. 12-Bromododecanoic acid binds inside the calyx of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett.* **1998a**, 438, 272-278.
- Ragona, L.; Pusterla, F.; Zetta, L.; Monaco, H.L.; Molinari, H. Identification of a conserved hydrophobic cluster in partially folded bovine β -lactoglobulin at pH 2. *Fold. Des.* **1997**, 2, 281-290.
- Ragona, L.; Catalano, M.; Zetta, L.; Longhi, R.; Fogolari, F.; Molinari, H. Peptide models of folding initiation sites of bovine β -lactoglobulin: Identification of nativelylike hydrophobic interactions involving G and H strands. *Biochemistry* **2002**, 41, 2786-2796.
- Renard, C.M.G.C.; Thibault, J-F. Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. *Carbohydr. Res.* **1993**, 244, 99-114.
- Renard, D.; Lefebvre, J.; Griffin, M.-C.-A.; Griffin, W.-G. Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, 22, 41-49.

- Rouw, P.W.; Woutersen, A.T.J.M.; Ackerson, B.J.; De Kruif, C.G. Adhesive hard sphere solutions V. Observation of spinodal decomposition in a colloid solution. *Phys. A* **1989**, *156*, 876-898.
- Sakurai, K.; Oobatake, M.; Goto, Y. Salt-dependent monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH 3. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2325-2335.
- Samant, S.K.; Singhal, R.S.; Kulkarni, P.R.; Rege, D.V. Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1993**, *28*, 547-562.
- Sanchez, C.; Mekhloufi, G.; Schmitt, C.; Renard, D.; Robert, P.; Lehr, C.-M.; Lamprecht, A.; Hardy, J. Self-assembly of β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous solvent: Structure and phase-ordering kinetics. *Langmuir* **2002**, *18*, 10323-10333.
- Sanchez, C. Communication personnelle, **2003**.
- Sawyer, L.; Kontopidis, G. The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482*, 136-148.
- Sawyer, L.; Kontopidis, G.; Wu, S.-Y. β -lactoglobulin - A three-dimensional perspective. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1999**, *34*, 409-418.
- Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660-672.
- Schmitt, C.; Sanchez, C.; Desobry-Banon, S.; Hardy, J. Structure and functional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1998**, *38*, 689-753.
- Schmitt, C.; Sanchez, C.; Despond, S.; Renard, D.; Robert, P.; Hardy, J. Structural modification of β -lactoglobulin as induced by complex coacervation with acacia gum. In *J. Food Colloids-Fundamentals of Formulation*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2001**, pp 323-331.
- Semenova, M.G.; Bolotina, V.S.; Dmitochenko, A.P. The factors affecting the compatibility of serum albumin and pectinate in aqueous medium. *Carbohydr. Polym.* **1991**, *15*, 367-385.

- Semenova, M.G. Factor determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems. In *Macromolecular Interactions in Food Technology*, ACS Symposium Series 650: Washington DC, **1996**, pp 37-49.
- Singh, O.N.; Burgess, D.J. Characterization of albumin-alginate complex coacervation. *J. Pharm. Pharmacol.* **1989**, *41*, 670-673.
- Serov, A.N.; Antonov, Y.A.; Tolstoguzov, V.B. Isolation of lactic whey proteins in the form of complexes with apple pectin. *Nahrung*, **1985**, *1*, 19-30.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Chem.* **1985**, *150*, 76-85.
- Stainsby, G. Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. *Food Chem.* **1980**, *6*, 3-14.
- Syrbe, A.; Bauer, W.J.; Klostermeyer, H. Polymer science concepts in dairy systems-An overview of milk protein and food hydrocolloids interaction. *Int. Dairy J.* **1998**, *8*, 179-193.
- Tainaka, K.-I. Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. I. Salt free systems. *J. Phys. Soc. Jpn* **1979**, *46*, 1899-1906.
- Tainaka, K.-I. Effect of counterions on complex coacervation. *Biopolymers* **1980**, *19*, 1289-1298.
- Tang, S.; Preece, J.M.; McFarlane, C.M.; Zhang, Z. Fractal morphology and breakage of DLCA and RLCA aggregates. *J. Colloid Interf. Sci.* **2000**, *221*, 114-123.
- Taulier, N.; Chalikian, T.V. Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* **2001**, *314*, 873-889.
- Teixeira, J. Small-angle scattering by fractal systems. *J. Appl. Cryst.* **1988**, *21*, 781-785.
- Timmer, J.M.K.; Speelmans, M.P.J.; van der Horst, H.C. Separation of amino acids by nanofiltration and ultrafiltration membranes, *Sep. Purif. Technol.* **1998**, *14*, 133-134.

- Tokaev, E.S.; Gurov, A.N.; Rogov, I.A.; Tolstoguzov, V.B. Properties of oil/water emulsions stabilized by casein-acid polysaccharide mixtures. *Nahrung* **1987**, *31*, 825-834.
- Tolstoguzov, V.B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In *Functional properties of food macromolecules*, Elsevier Applied Science: London, **1986**, pp 385-415.
- Tolstoguzov, V.B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocoll.* **1991**, *4*, 429-468.
- Tolstoguzov, V.B. Protein-polysaccharide interactions. In *Food proteins and their applications*, Marcel Dekker, Inc.: New York, **1997**, pp 171-198.
- Tolstogulzov, V.B. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2002**, *22*, 89-174.
- Tomme, P.; Creagh, A.L.; Kilburn, D.G.; Haynes, C.A. Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC: 1. Binding specificity and calorimetric analysis. *Biochem.* **1996**, *35*, 13885-13894.
- Tromp, R.H.; Rennie, A.R., Jones, R.A.L. Kinetics of the simultaneous phase separation and gelation in solutions of dextran and gelatin. *Macromolecules* **1995**, *28*, 4129-4138.
- Tsuboi, A.; Izumi, T.; Hirata, M.; Xia J.; Dubin, P.L.; Kokufuta, E. Complexation of proteins with a strong polyanion in an aqueous salt-free system. *Langmuir* **1996**, *12*, 6295-6303.
- Tuinier, R.; Dhont, J.K.G.; De Kruif, C.G. Depletion-induced phase separation of aggregated whey protein colloids by an exocellular polysaccharide. *Langmuir* **2000**, *16*, 1497-1507.
- Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F.; Mollé, D.; Léonil J. Interfacial properties of tryptic peptides of β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* **1992a**, *40*, 669-675.
- Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F.; Paquin, P. Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. *J. Food Sci.* **1992b**, *57*, 601-604.

- Ustunol, Z.; Xiong, Y.L.; Means, W.J.; Decker, E.A. Forces involved in mixed pork myofibrillar protein and calcium alginate gels. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 577-580.
- van Bruggen, M.P.B; Dhont, J.K.G; Lekkerkerker, H.N.W. Morphology and kinetics of the isotropic-nematic phase transition in solutions of hard rods. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2256-2264.
- van Oss, C.J. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids Surf. A* **1993**, *78*, 1-49.
- Veis, A.; Aranyi, C. Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 1203-1210.
- Voragen, A.G.J.; Pilnik, W.; Thibault, J.-F.; Axelos, M.A.V.; Renard, C.M.G.C. Pectins. In *Food Polysaccharides and their Applications*, Marcel Dekker Inc.: New York, **1995**, pp 287-339.
- Walkinshaw, M.D.; Arnott, S. Conformation and interactions of pectins. II: models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. *J. Mol. Biol.* **1981**, *153*, 1075-1085.
- Wang, Y.; Dubin, P.L. Protein binding on polyelectrolyte-treated glass: Effect of microscopic structure of adsorbed polyelectrolyte. *J. Chromatogr.* **1998**, *808*, 61-70.
- Wang, Q.; Qvist, K.B. Investigation of the composite system of β -lactoglobulin and pectin in aqueous solutions. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 683-690.
- Wangsakan, A.; Chinachoti, P.; McClements, D.J. Maltodextrin-anionic surfactant interactions: isothermal titration calorimetry and surface tension study. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5039-5045.
- Wen, Y-P.; Dubin, P.L. Potentiometric studies of the interaction of bovine serum albumin and poly(dimethyldiallylammonium chloride). *Macromolecules* **1997**, *30*, 7856-7861.
- West, S.M.; Guise, A.D.; Chaudhuri, J.B. A comparison of the denaturants urea and guanidine hydrochloride on protein refolding. *Trans. Inst. Chem. Eng.* **1997**, *75*, 50-56.

- Wiseman, T.; Williston, S.; Brands, J.F.; Lin, L.-N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 131-137.
- Wu, S.-Y.; Pérez, M.D.; Puyol, P.; Sawyer, L. β -lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 170-174.
- Xia, J.; Dubin, P.L. Dynamic and electrophoretic light scattering of a water-soluble complex formed between pepsin and poly(ethylene glycol). *Macromolecules* **1993**, *26*, 6688-6690.
- Xia, J.; Dubin, P.L. Protein-polyelectrolyte complexes. In: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer Verlag: Berlin, **1994**, pp 247-271.
- Xia, J.; Dubin P.L.; Kokufuta, E.; Havel, H.; Muhoberac, B.B. Light scattering, CD, and ligand binding studies of ferrihemoglobin-polyelectrolyte complexes. *Biopolymers* **1999**, *50*, 153-161.
- Yang, C-C.; Chen, C-C.; Chang, H-M. Separation of egg white lysozyme by anionic polysaccharides. *J. Food Sci.* **1998**, *63*, 962-965.
- Zaleska, H., Ring, S.G., Tomasik, P. Apple pectin complexes with whey protein isolate, *Food Hydrocoll.* **2000**, *14*, 377-382.
- Zancong, S.; Mitragotri, S. Intestinal patches for oral drug delivery. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 391-395.