

Gélification des protéines lactosériques en présence de saccharose

II. Etude biochimique

par

L. RAZANAJATOVO et C. ALAIS

*Laboratoire de Biochimie Appliquée
Université de Nancy I, C.O. 140 - 54037 Nancy*

INTRODUCTION

Dans une précédente communication [1], nous avons décrit un nouveau procédé de gélification des protéines du rétentat de lactosérum par chauffage sous pression en présence de saccharose [2], et nous avons présenté les résultats concernant l'influence de paramètres physicochimiques sur les propriétés rhéologiques du gel : concentration relative en protéine et en saccharose, condition du traitement thermique, pH du mélange.

Nous avons cherché à expliquer ce phénomène de gélification et nous avons entrepris deux séries de recherche, l'une par des moyens chimiques et l'autre par des moyens physiques (diffusion de la lumière, microscopie électronique). Ce sont les résultats de la première série qui sont exposés ici.

MATERIEL ET METHODES

Les séroprotéines utilisées sont sous la forme de rétentat d'ultrafiltration, à l'état liquide, contenant 42 p. 100 de matière sèche. Celle-ci renferme 37 p. 100 de protéines et 6 p. 100 de cendres.

La gélification a été obtenue par un chauffage de 5 mn en récipient hermétique sous une pression de 0,5 bar. On a le plus souvent traité le mélange contenant 5 p. 100 de protéines ($N \times 6,38$) et 30 p. 100 de saccharose. La fermeté du gel a été mesurée au moyen d'un pénétromètre dans les conditions précédemment décrites [1].

Le dosage des groupes sulfhydryles a été fait avec le réactif d'Ellman selon la technique de Beveridge *et al.* [3] ; les ponts disulfures ont été déterminés par différence, après réduction par le 2-mercaptoéthanol.

Le blocage des groupes hydroxyles libres du saccharose a été obtenu par perméthylation selon la méthode de Bredereck *et al.* [4] qui utilise le diméthylsulfate en milieu alcalin.

Le dosage des acides aminés a été effectué après hydrolyse acide totale (112° C, HCl 6 N, 24 h). La digestibilité a été appréciée par l'hydrolyse enzymatique au moyen de la pepsine et de la pancréatine, selon la méthode de Mauron *et al.* [5]. L'incubation avec la pepsine a lieu à pH 2, à 37° C, durant 3 h ; elle est suivie d'une incubation avec la pancréatine à pH 8, à 37° C, durant 24 h ; les acides aminés libérés sont dosés dans le surnageant après déprotéinisation par l'acide trichloracétique à 12 p. 100.

RESULTATS

Rôle du calcium

Dans cent parties du mélange contenant 5 p. 100 de protéines lactosériques et 30 p. 100 de saccharose, il y a 87 mM de calcium. Nous avons ajouté des concentrations croissantes d'agents complexant le calcium : EDTA, oxalate de sodium, citrate de sodium, allant de 0 à 250 mM. Le tableau 1 montre l'évolution de la fermeté par rapport au gel témoin. La fermeté est réduite par les trois anions complexants. La chute est brusque à la concentration de 50 mM, mais l'effet de désorganisation du gel est beaucoup plus marqué en présence d'EDTA ; à la concentration de 250 mM on ne peut plus effectuer une mesure car le gel ne se forme plus après le traitement. Il est évident que l'ion Ca^{++} intervient dans la gélification.

On peut restaurer la gélification par addition de calcium dans le mélange contenant 50 mM de chacun des trois agents complexants. Le témoin est représenté par le mélange normal auquel on ajoute du calcium (fig. 1).

En présence d'EDTA, la fermeté normale (100) est retrouvée lorsque le taux de calcium ajouté est de 95 mM environ. Pour le système contenant les autres anions complexants, le taux de calcium est plus faible, de l'ordre de 40 et 47 mM. Dans le témoin, l'addition de calcium accroît également la fermeté.

Rôle des ponts disulfures

Le taux de — SH libres diminue beaucoup (de l'ordre de 37 p. 100) après traitement thermique. Cette diminution est compensée exactement par une augmentation des ponts disulfures (tab. 2). Les groupes

TABLEAU 1

Influence des agents complexant le calcium sur la fermeté du gel
(valeurs relatives)

Concentration mM	EDTA	Oxalate	Citrate
0	100	100	100
25	92	97	99
50	28	81	84
100	20	81	84
125	17	81	83
250	—	81	83

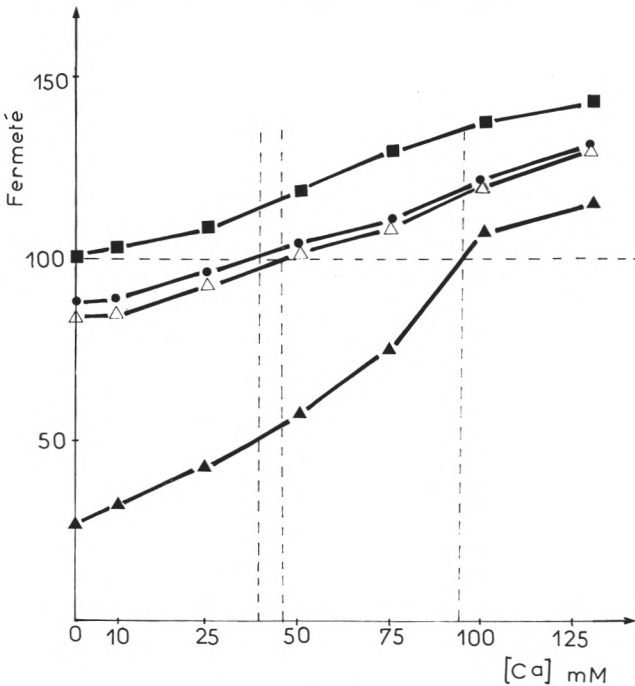


fig. 1

Restauration de la gélification par addition de calcium dans le mélange contenant 50 mM d'EDTA (▲—▲), 50 mM d'oxalate (△—△), 50 mM de citrate (●—●), sans agents complexants (■—■).

TABLEAU 2
Effet du traitement thermique sur les groupes —SH et S-S
(gel à pH 5,9)

	— SH libres*	S-S*
Avant traitement	15,20	13,40
Après traitement (112° C - 5 mn)	9,65 (— 5,55)	16,17 (+ 2,77)

* en mM.

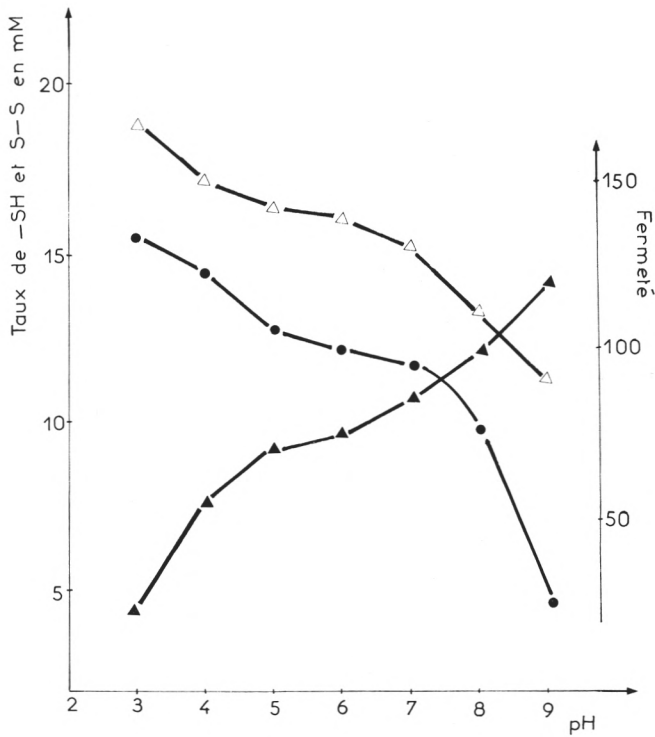


fig. 2

Influence du pH sur la rhéologie du gel (●—●) et sur le taux de —SH (▲—▲) et de S-S (△—△).

—SH jouent donc un rôle dans la formation du gel en permettant l'établissement des ponts disulfures, sans négliger les réactions d'échange de liaisons S-S.

L'équilibre entre les groupes —SH et les ponts S-S est cependant affecté par la variation du pH. Le gel témoin a un pH de 5,9. Nous avons fait varier le pH du mélange protéine-sucre de 3 à 9 et le dosage des groupes —SH et des ponts S-S a été fait sur les produits obtenus.

La figure 2 montre que les groupes —SH augmentent avec le pH (de 4,4 mM à 14,2 mM). Cette augmentation s'accompagne d'une diminution des ponts disulfures de 18,8 mM à 11,4 mM. La variation est faible dans la zone des pH neutres et forte en milieu alcalin et acide.

Si l'on compare ces résultats avec ceux concernant la fermeté du gel obtenu à différents pH [1] nous voyons que la fermeté du gel augmente lorsque les ponts disulfures sont favorisés c'est-à-dire, dans la zone des pH acides. Entre pH 5 et 7, la faible variation des groupes SH et des ponts S-S peut être associée à la faible différence de fermeté qui se retrouve dans le gel.

La structure désorganisée (le gel n'est pas formé) que l'on observe en milieu alcalin peut s'expliquer par la diminution des ponts disulfures dont le taux serait ici insuffisant pour maintenir la structure du gel.

Ces résultats montrent que les ponts disulfures sont impliqués dans l'élaboration de la structure du gel, soit par liaison entre groupes —SH, soit par échange de liaisons S-S. Ils montrent que le pH joue un rôle important.

Pour confirmer l'intervention des groupes —SH dans la gélification nous avons procédé à un blocage de ces groupes par la N-éthylmaléimide (NEM) et le mercapto-2-éthanol ; la courbe obtenue (fig. 3) montre que la fermeté du gel (à 5 p. 100 de protéines et 30 p. 100 de saccharose) diminue beaucoup lorsque la concentration en réactif des groupes —SH est comprise entre 10 et 20 mM. Le produit obtenu est à peine gélifié ; il s'écoule facilement. La présence de ces agents détruit donc la structure du gel, l'effet du NEM étant le plus marqué. Signalons que le produit chauffé obtenu en présence de ces agents est dispersible dans l'eau. Le dosage des matières azotées a montré que 30,4 p. 100 des protéines sont solubles dans ces conditions ; alors que dans le cas du gel témoin, il ne passe pas de substances azotées dans l'eau [1].

Influence de la force ionique

Le mélange témoin contient 0,51 p. 100 de cendres dont 0,32 p. 100 de chlorures. Dans un but expérimental, on peut soit augmenter la force ionique initiale par addition de chlorures, soit la réduire par dialyse. L'addition des ions Na^+ ou K^+ influe très peu sur les propriétés du gel et son aspect :

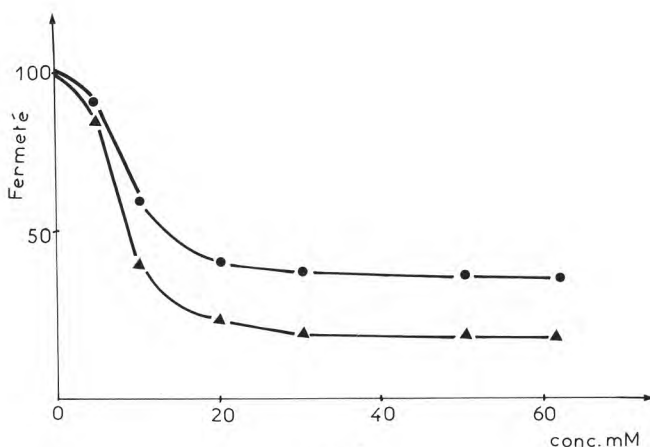


fig. 3

Effet des agents bloquant les groupes SH sur la rhéologie du gel (●—●) mercapto-2-éthanol ; (▲—▲) NEM.

fermeté avec NaCl 50 mM : 101 ;

fermeté avec NaCl 150 mM : 110 ;

fermeté avec KCl 50 mM : 104 ;

fermeté avec KCl 150 mM : 107.

La dialyse contre l'eau a peu d'effet lorsqu'elle est limitée à 1 ou 2 j. Après une dialyse prolongée, la fermeté diminue :

fermeté après 1 j de dialyse des lactoprotéines : 100 ;

fermeté après 2 j de dialyse des lactoprotéines : 94 ;

fermeté après 6 j de dialyse des lactoprotéines : 82.

La diminution doit résulter de l'abaissement de la teneur en calcium, qui est éliminé plus lentement que le sodium et le potassium.

Rôle de la composante glucidique

Dans l'étude des facteurs physicochimiques [1], nous avons montré que la présence du saccharose est indispensable pour obtenir un gel avec 5 p. 100 de protéines. Il est donc important de déterminer à quel niveau intervient cette substance pour permettre la gélification.

Si les liaisons protéines-sucre existent, elles ne pourront s'établir que par l'intermédiaire des huit groupes hydroxyles libres du saccharose. Nous avons donc bloqué les groupes OH par une perméthylation. Le produit obtenu a été contrôlé par la résonance magnétique nucléaire : le saccharose traité est heptaméthylé.

Nous avons chauffé le mélange 5 p. 100 protéines + 30 p. 100 saccharose méthylé à 112° C pendant 5 mn. On observe simplement une floculation ; le gel ne se forme pas. Ceci montre que les groupes OH interviennent dans la formation du gel.

Pour confirmer nos résultats, nous avons effectué des essais de gélification avec d'autres molécules possédant des groupes hydroxyles libres. Le tableau 3 montre que la gélification se produit avec les six substances utilisées. La fermeté des gels obtenus est presque la même que celle du témoin sauf dans le cas du glycérol (polyol en C₃) qui donne un gel plus fragile. La forme de la molécule n'intervient donc pas dans la gélification. Il suffit d'un certain nombre de groupes OH libres pouvant assurer des liaisons pour que la gélification se produise.

TABLEAU 3

Essais de gélification avec d'autres glucides que le saccharose

Glucides	Gélification	Aspect du gel*	Fermeté
Fructose	+	brunissement	91
Glucose	+	brunissement	94
Glycérol	+	fragile	82
Méthyl α D-glucose	+	lisse, blanc	91
Sorbitol	+	lisse, blanc	93
α - α' Tréhalose	+	lisse, blanc	98

* Gel de protéines (5 p. 100) et de sucre (30 p. 100).

Etat des acides aminés après traitement thermique

Nous avons mené une étude limitée d'un point de vue nutritionnel en déterminant la disponibilité des acides aminés après traitement thermique.

Le dosage d'acides aminés, après hydrolyse acide totale dans le mélange protéine-sucre, avant et après chauffage (tab. 4), a montré que les proportions sont peu ou pas modifiées après chauffage pour la plupart des acides aminés, sauf les basiques. La lysine est réduite

TABLEAU 4

Composition en acides aminés du mélange séro-protéines-saccharose
(g A.A./100 g protéines)*

	Avant chauffage	Après chauffage (gel)
Asp.	12,10	11,88
Thr.	5,96	5,94
Ser.	5,50	5,22
Glu.	20,24	20,22
Pro.	4,98	4,76
Gly.	2,44	2,46
Ala.	4,36	4,34
Val.	6,54	6,34
Met.	2,40	2,42
Ile.	6,26	5,86
Leu.	12,96	11,68
Tyr.	3,28	3,18
Phe.	3,88	4,08
Lys.	12,26	10,80
His.	2,16	1,46
Arg.	3,32	2,04

* Hydrolyse acide, HCl 6N, 112° C, 24 h (moyenne de trois résultats provenant de trois hydrolysats).

de 10 p. 100 environ alors que l'arginine et la lysine sont réduites de 30 à 40 p. 100.

Nous avons étudié la digestibilité « in vitro » des protéines du gel en utilisant le mélange pepsine-pancréatine. Cette méthode permet de déterminer la disponibilité des acides aminés ayant subi ou non des traitements technologiques [5]. Nous remarquons dans le

tableau 5 que la libération des acides aminés est à peu près la même pour la plupart d'entre eux. La baisse est autour de 10 p. 100 pour les trois suivants : Leu, Phe et Arg ; elle n'est que de 6 p. 100 pour la lysine.

TABLEAU 5

Hydrolyse enzymatique par le mélange pepsine + pancréatine des protéines du sérum g d'A.A./100 g de protéines

	Mélange non chauffé	Après chauffage
Ser.	0,32 (5,9)	0,31 (5,9)
Glu.	0,16 (0,8)	0,15 (0,7)
Gly.	0,58 (23,7)	0,57 (23,1)
Ala.	1,87 (42,8)	1,89 (43,5)
Val.	3,08 (47,1)	2,94 (46,3)
Met.	—	—
Ile.	2,28 (36,4)	2,24 (38,2)
Leu.	7,18 (55,4)	6,61 (56,5)
Tyr.	0,83 (25,3)	0,81 (25,4)
Phe.	0,81 (20,8)	0,73 (17,8)
Lys.	9,05 (73,8)	8,51 (78,7)
His.	0,32 (14,8)	0,34 (23,2)
Arg.	0,56 (16,8)	0,50 (24,5)

(...) Taux d'hydrolyse enzymatique par rapport à l'hydrolyse acide (moyenne de trois digestions).

DISCUSSION

La gélification des protéines lactosériques en présence de saccharose implique les interactions intermoléculaires assurées par les ponts calcium et les ponts disulfures.

D'une part, lorsque le calcium est rendu indisponible par l'action des agents complexants (oxalate, citrate, EDTA) le gel ne se forme pas correctement et il suffit d'ajouter du calcium ionisé pour que la gélification normale se produise. L'addition de calcium dans le gel témoin montre bien que plus le taux de calcium disponible augmente, plus le gel est ferme indiquant un nombre croissant de ponts calcium engagés dans la structure. Ceci confirme le rôle du calcium dans la gélification. Les liaisons avec l'ion Ca^{++} peuvent s'établir par les groupes COOH libres des acides aminés. Ce type de liaison a été démontré dans la gélification de l'acide pectique, riche en COOH , en présence de calcium [6].

D'autre part, la rupture des ponts disulfures et le blocage des groupes —SH par le NEM et le mercaptoéthanol [7, 8] défavorisent les interactions qui s'établissent entre les constituants des séroprotéines pour organiser la structure du gel : ce qui implique les groupes —SH et les ponts SS dans la gélification. D'ailleurs, la diminution des groupes —SH après chauffage montre bien que ces groupes sont engagés dans l'établissement de ponts disulfures, du fait que le taux de ces derniers a augmenté. Bien que les groupes —SH libres paraissent être localisés dans la β -lactoglobuline [9] et que l' α -lactalbumine n'en contienne pas, plusieurs auteurs comme Wingerd [10], Baer *et al.* [11], Shalabi et Wheelock [12] ont précisé que l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline sont capables de former des liaisons intermoléculaires par échange de liaisons disulfures. Nous pensons que cette liaison disulfure est celle qui intervient pour assurer la stabilité de la structure du gel du fait que l'irréversibilité du gel a disparu lorsque cette liaison est rompue.

Outre l'intervention des ponts calcium et des liaisons disulfures dans la gélification, nous confirmons que des liaisons hydrogènes participent à l'organisation du gel comme cela a été signalé dans nos travaux antérieurs [1]. L'effet du saccharose méthylé montre que le saccharose normal intervient dans la gélification en engageant des liaisons hydrogènes avec la partie protéique par l'intermédiaire de ses groupes hydroxyles libres. D'ailleurs, l'obtention d'un gel avec d'autres molécules glucidiques ou des polyols confirme bien l'intervention de ces groupes dans la gélification.

On sait que la composition des protéines du lactosérum en acides aminés est très favorable pour l'alimentation humaine et que l'état de la lysine est un indice important pour juger de la valeur nutritive après un traitement thermique. La lysine est en effet un acide aminé essentiel beaucoup plus sensible à la chaleur que d'autres acides aminés dans un milieu biologique [13]. Nos résultats montrent que le traitement de gélification modifie peu la composition en acides aminés après hydrolyse acide totale, sauf pour l'arginine et l'histidine. En outre, la disponibilité de la lysine, mesurée par hydrolyse enzymatique, est peu affectée ; la libération n'est réduite que de 6 p. 100. Malgré la température requise (112°C), la durée limitée du chauffage

(5 mn) en récipient hermétique et le pH (5,9) réduisent certaines réactions modifiant l'état de la lysine, telles que les réactions de Maillard et les réactions de transamidation [14].

Remerciements

Nous remercions vivement M. le professeur Gross, de l'Université de Nancy pour ses conseils et son appui dans l'étude du rôle de la partie glucidique.

Nous remercions la Compagnie Française de Diététique (Caen) pour son aide matérielle.

Résumé

La gélification des protéines lactosériques en présence de saccharose, par chauffage sous pression (0,5 bar) met en jeu plusieurs types de liaisons intermoléculaires. Les ions calcium et l'établissement de ponts disulfures sont nécessaires à la formation du gel. Les liaisons salines ne sont pas en cause. L'effet du saccharose perméthylé montre que les groupes hydroxyles de glucides participent à la gélification en engageant des liaisons hydrogènes avec la partie protéique. D'autres substances glucidiques et des polyols permettent également l'obtention du gel. La composition en acides aminés est peu modifiée par le traitement ; la disponibilité de la lysine reste élevée.

Summary

THE GELATION OF WHEY PROTEINS IN THE PRESENCE OF SACCHAROSE II. BIOCHEMICAL STUDIES

The gelation after heating under pressure (0,5 bar) is the consequence of three kinds of intermolecular linkages. Calcium ions and disulphide bridges are necessary to the formation of the gel. The hydroxyl groups of saccharose allow hydrogen bonds with the proteins; permethylated saccharose does not give a gel. Some other glucides and polyols can give a gel. The treatment does not alter the aminoacid composition, and the disponibility of lysine is little affected.

Reçu pour publication en novembre 1978.

Bibliographie

- [1] RAZANAJATOVO (L.), ALAIS (C.) et PAUL (R.) (1978). — *Le Lait*, 58, 483.
- [2] PAUL (R.) et LEGRAND (C.) (1976). — Brevets déposés.

- [3] BEVERIDGE (T.), ROMA (S. J.) and NAKAI (S.) (1974). — *J. Food Sci.*, 39, 49.
- [4] BREDERECK (H.), HAGELLOCH (G.) and HAMBSCH (E.) (1954). — *Chem. Ber.*, 87, 37.
- [5] MAURON (J.), MOTTU (F.), BUJARD (E.) and EGLI (R. H.) (1955). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 59, 433.
- [6] KALAB (M.) (1977). — *Milchwissenschaft*, 32, 719.
- [7] NAKAI (S.), WILSON (H. K.) and HERREID (E. D.) (1965). — *J. Dairy Sci.*, 48, 431.
- [8] SAWYER (W. H.) (1968). — *J. Dairy Sci.*, 51, 323.
- [9] LYSTER (R. L. J.) (1964). — *J. Dairy Res.*, 31, 41.
- [10] WINGARD (W. H.) (1971). — *J. Dairy Sci.*, 54, 1234.
- [11] BAER (A.), OROZ (M.) and BLANC (B.) (1976). — *J. Dairy Res.*, 43, 419.
- [12] SHALABI (S. I.) and WHEELLOCK (J. V.) (1977). — *J. Dairy Res.*, 44, 351.
- [13] ADRIAN (J.) (1975). — *Le Lait*, 55, 24.
- [14] BJARNASON (J.) and CARPENTER (K. J.) (1970). — *Br. J. Nutr.*, 24, 314.
-