UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE ET DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, U.P.R. 6811
LABORATOIRE DES SCIENCES DU GENIE CHIMIQUE
GROUPE DES PROCEDES BIOTECHNOLOGIQUES ET ALIMENTAIRES

N° attribué par la bibliothèque
| _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

présentée et soutenue publiquement

par

Gérald CHABANON

le 19 octobre 2005

HYDROLYSES ENZYMATIQUES D'ISOLATS PROTEIQUES ISSUS DE TOURTEAUX DE COLZA : CINETIQUE, MODELISATION, CARACTERISATION ET FONCTIONNALITE DES PEPTIDES

JURY

Présidente :	Mme Annie MARC	Directeur de Recherche (C.N.R.S., Nancy)
Rapporteurs :	Mr Pascal DHULSTER	Professeur (Institut Universitaire de Technologie de Lille)
	Mr Frédéric SANNIER	Professeur (Université de La Rochelle)
Examinateurs :	Mme Magali ROCHER	Ingénieur A.D.E.M.E (Angers)
	Mme Nadine CHOMARAT	Ingénieur C.U.S.T (I.R.P.F., Gaillac)
	Mme Isabelle CHEVALOT	Maître de Conférences (E.N.S.A.I.A., Nancy)
	Mr Ivan MARC	Directeur de Recherche (C.N.R.S., Nancy)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire :

Mr Michel SARDIN, Directeur du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC),
Mr Michel FICK, Responsable du Groupe Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires du LSGC,
qui m'ont accueilli dans leur laboratoire.

Mme Annie MARC, Directeur de recherche au CNRS,
qui a accepté de présider cette thèse.

Mr Pascal DHULSTER, Professeur à l'IUT de Lille,
Mr Frédéric SANNIER, Professeur à l'Université de La Rochelle,
qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Mr Ivan MARC, Directeur de Recherche au CNRS,
qui a été le directeur de cette thèse.

Mme Isabelle CHEVALOT, Maître de Conférences à l'ENSAIA, co-directrice de cette thèse,
pour sa disponibilité, son implication, ses nombreux et bons conseils, ses encouragements, son soutien et la confiance qu'elle m'a portée.

Mme Magali ROCHER, Ingénieur ADEME,
Mr Stéphane CHENU, Docteur/Ingénieur de recherche à l'Institut de Recherche PIERRE FABRE,
qui ont régulièrement suivi ce travail et qui, par leurs conseils, ont permis d'enrichir ce travail.

Mme Nadine CHOMARAT, Ingénieur CUST,
qui a accepté de faire partie du jury de thèse.

Mr Frantz FOURNIER, Maître de Conférences à l'ENSAIA,
Mr Xavier FRAMBOISIER, Ingénieur au LSGC,
Mme Christelle HARSCOAT-SCIAVO, Chargé de Recherche au CNRS,
Mr Fabrice BLANCHARD, Ingénieur au CNRS,
Mr Bernard PARISET, Ingénieur au CNRS,
qui ont réalisé certaines expériences fondamentales de ce travail tout en m'enseignant les bases des techniques utilisées.

Eric OLMOS, Maître de Conférences à l'ENSAIA,
Emmanuel RONDAGS, Maître de Conférences à l'ENSAIA,
pour leur convivialité et leur bonne humeur.

Et enfin, tout mon entourage, qui m'a encouragé et supporté tout au long de la thèse, et particulièrement
Alice, **mes parents**, **ma grand-mère**, **mes frères et belles-soeurs**, **ma famille**, **Annette**, **Bertrand**, **Laurent**, **Emilie**, **Florent**,
Anissa, **Ligia**, **Wafa**, **Feno**, **Nadine**, **Bérangère**, **Guillaume**, **Sophie**, **Isabelle**,
les « anciens Prabilois » et Etapiens, **Pierre-George**, **Jean-Claude**, **Pascale**, **Sophie**, **Damien**, **Laurence**, **Michael**, **Gigi**.

SOMMAIRE.

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE : BIBLIOGRAPHIE 4

I. LE COLZA, SON TOURTEAU ET SES PROTEINES. *4*

I.1. LE COLZA. 4
I.1.1. Généralités. *4*
I.1.2. Production de graines et d'huile de colza. *5*
I.1.3. Sélections et modifications génétiques du colza. *5*
I.1.4. Procédé d'extraction de l'huile des graines. *6*

I.2. LE TOURTEAU DE COLZA. 8
I.2.1. Une matière première riche en protéines. *8*
I.2.2. Les protéines de la graine de colza. *9*
I.2.2.1. Les différents types de protéines. *9*
I.2.2.2. Valeur nutritionnelle des protéines de tourteaux de colza. *9*
I.2.2.3. La cruciférine. *11*
I.2.2.4. Les napines. *12*
I.2.2.5. Les oléosines et la myrosinase. *13*
I.2.3. Les composés « antinutritionnels ». *13*
I.2.3.1. Les glucosinolates. *13*
I.2.3.2. Les polyphénols. *14*
I.2.3.3. L'acide phytique. *16*
I.2.3.4. Les molécules d'origine protéique. *17*

I.3. CONCENTRATS ET ISOLATS DE PROTEINES DE COLZA. 17
I.3.1. Préparation de concentrats protéiques. *18*
I.3.1.1. Préparation classique de concentrats protéiques. *18*
I.3.1.2. Autres procédés de concentration des protéines de la farine. *20*
I.3.2. Préparation d'isolats protéiques. *20*
I.3.2.1. Méthodes de solubilisation des protéines. *21*
I.3.2.2. Méthodes de récupération des protéines solubilisées. *23*
** Récupération des protéines extraites par précipitation.* *23*
** Récupération des protéines extraites par ultrafiltration et diafiltration.* *23*
I.3.3. Séparation entre les globulines et les albumines de colza. *24*

I.4. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES PROTEINES DE COLZA 24

II. PROTEOLYSE ET PEPTIDES. *28*

II.1. GENERALITES. 28
II.1.1. La synthèse de peptides. *28*
II.1.2. La production de peptides par protéolyse. *29*

II.2. PROPRIETES NUTRITIONNELLES, SENSORIELLES ET ANTIOXYDANTES DES PEPTIDES. 31
II.2.1. Propriétés nutritionnelles des peptides et aliments diététiques. *31*
II.2.2. Propriétés sensorielles. *32*
II.2.3. Les peptides antioxydants. *33*

II.3. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES PEPTIDES. 33
II.3.1. La solubilité et les propriétés rhéologiques. *34*
II.3.3. Propriétés émulsifiantes. *35*
II.3.3. Propriétés moussantes. *36*

II.4. ACTIVITES PHYSIOLOGIQUES OU BIOLOGIQUES DES PEPTIDES. 36
II.4.1. Les peptides opioïdes. 38
II.4.2. Les peptides anti-ACE. 39
II.4.3. Les peptides antimicrobiens. 39
II.4.4. Multifonctionnalité d'un peptide. 39

II.5. PEPTIDES ET MILIEUX DE CULTURE POUR CELLULES PRO- ET EUCARYOTES. 40
II.5.1. Activités des peptides dans les milieux de fermentation. 40
II.5.2. Activités des peptides dans les milieux de culture de cellules eucaryotes. 40

II.6. HYDROLYSATS DE PROTEINES DE COLZA. 42

III. PROCEDES DE PROTEOLYSE ENZYMATIQUE, MODELISATION ET CARACTERISATION DES PEPTIDES. 44

III.1. PROCEDES DE PROTEOLYSE ENZYMATIQUE. 44
III.1.1. Les protéases et les sources protéiques. 45
III.1.1.1. Les différents types de protéases. 45
III.1.1.2. Mesure de l'activité enzymatique. 47
III.1.1.3. Les différentes sources protéiques. 48
III.1.2. Les paramètres de l'hydrolyse. 49
III.1.2.1. Le pH. 49
III.1.2.2. La température. 49
III.1.2.3. La concentration initiale en protéines (So) et en enzyme (Eo). 50
III.1.2.4. Les autres paramètres opératoires. 51
III.1.2.5. Le degré d'hydrolyse (DH). 51
III.1.3. Les méthodes de contrôle de l'hydrolyse. 51
III.1.3.1. Méthode au TCA et méthode de la dialyse. 53
III.1.3.2. Méthodes au TNBS, à l'OPA et à la ninhydrine. 53
III.1.3.3. Méthode du pH-Stat. 55
III. 1.3.4. Méthode de l'osmométrie. 56
III.1.4. Les procédés de mise en œuvre de l'hydrolyse. 56
III.1.4.1. Réacteurs discontinus 56
III.1.4.2. Réacteurs continus. 57

III.2. MODELISATION DE L'HYDROLYSE DANS DES REACTEURS DISCONTINUS. 59
III.2.2. Modèles empiriques et phénoménologiques de la protéolyse. 61
III.2.2.1. Généralités sur les modèles. 62
III.2.2.2. Abaques du contrôle de l'hydrolyse. 62
III.2.2.3. Modèles comportementaux de la protéolyse. 63
III.2.2.4. Modèles phénoménologiques de la protéolyse. 64
** Inhibition de l'enzyme par excès de substrat. 65*
** Inhibition de l'enzyme par les molécules non-protéiques du substrat. 66*
** Modification du substrat protéique. 66*
** Inhibition de l'enzyme par les produits de l'hydrolyse. 67*
** Autolyse de l'enzyme. 67*
** Dénaturation thermique, chimique ou mécanique de l'enzyme. 68*
** Quelques schémas réactionnels mis en évidence. 70*

III.3. CARACTERISATION DES PEPTIDES. 71
III.3.1. Les techniques chromatographiques. 71
III.3.1.1. Chromatographie haute performance en phase inverse (CLHP-PI). 72
** Séparation par CLHP-PI. 71*
** Couplage CLHP-PI et spectrométrie de masse. 73*
III.3.1.2. Chromatographie haute performance d'exclusion de taille (CLHP-ET). 73
III.3.1.3. Chromatographie haute performance d'échange d'ions (CLHP-EI). 74
III.3.2. Les techniques électrophorétiques. 75
III.3.2.1. L'électrophorèse sur gel (SDS-PAGE). 75
III.3.2.2. L'électrophorèse capillaire (EC). 75

CHAPITRE : MATERIEL ET METHODES 77

I. PREPARATION DES SUBSTRATS PROTEIQUES. 77

I.1. LE TOURTEAU DE COLZA. 77

I.2. PROTOCOLES POUR LA PREPARATION D'ISOLATS PROTEIQUES. 77
I.2.1. Procédés préliminaires. 77
I.2.2. Amélioration du procédé n° 2 pour l'obtention d'isolats protéiques. 79
I.2.3. Préparation des isolats en grande quantité. 80

I.3. PURETE PROTEIQUE ET RENDEMENT PROTEIQUE. 81

II. HYDROLYSE ENZYMATIQUE. 82

II.1. PROTEASES SELECTIONNEES. 82

II.2. ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES ENZYMES. 83
II.2.1. Activité protéolytique totale à pH 7,5 et 40 °C suivant la méthode de Anson. 83
II.2.2. Modélisation de l'activité protéolytique en fonction du pH et de la température. 84
II.2.2.1. Valeurs expérimentales de l'activité protéolytique. 84
II.2.2.2. Modélisation de l'activité protéolytique en fonction du pH et de la température. 85

II.3. MISE EN ŒUVRE DE L'HYDROLYSE ET SUIVI DE L'HYDROLYSE PAR LA METHODE PH-STAT. 86
II.3.1. Préparation du substrat et de la protéase pour l'hydrolyse. 86
II.3.2. Suivi de l'hydrolyse par la méthode du pH-Stat. 87
II.3.3. Mise en œuvre de l'hydrolyse. 88

II.4. CALIBRATION DE LA METHODE DU PH-STAT AVEC CELLE AU TNBS. 89

II.5. ETUDE CINETIQUE. 91
II.5.1. Détermination des constantes cinétiques Km, Vm et k_2. 91
II.5.2. Dénaturation thermique et activation thermique des enzymes. 92
II.5.2.1. Dénaturation thermique des enzymes. 92
II.5.2.2. Activation thermique des enzymes. 93
II.5.3. Mise en évidence des phénomènes impliqués dans l'hydrolyse. 94
II.5.3.1. Inhibition des protéases par un excès de substrat. 94
II.5.3.2. Evolution de la nature du substrat au cours de l'hydrolyse. 94
II.5.3.3. Inactivation enzymatique au cours de l'hydrolyse. 95
** Remplacement de l'enzyme par ajout d'enzyme fraîche.* 95
** Test de Selwyn.* 95
I.5.3.4. Autolyse des enzymes. 96
II.5.3.5. Inhibition par les produits finaux de l'hydrolyse. 97

II.6. MODELISATION PHENOMENOLOGIQUE DES CINETIQUES D'HYDROLYSE. 98

III. METHODES ANALYTIQUES. 99

III.1. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES SUBSTRATS ET DES HYDROLYSATS. 99
III.1.1. Teneur en protéines totales. 99
III.1.2. Humidité et teneur en cendres. 99
III.1.3. Teneur en lipides. 100
III.1.4. Teneur en polyphénols. 100
III.1.4.1. Teneurs en polyphénols totaux et en tanins. 100
III.1.4.2. Teneur en acides phénoliques totaux. 102
III.1.5. Teneur en acide phytique. 103
III.1.6. Teneur en fibres et en sucres. 104

III.2. COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA MATIERE PROTEIQUE. 104
III.2.1. Préparation des échantillons. 104
III.2.2. Protocole de dosage des acides aminés. 105

III.3. ELECTROPHORESE SUR GEL. 106

III.4. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE D'EXCLUSION DE TAILLE (CLHP-ET). 107

III.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSE (CLHP-PI) COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE. 109

III.6. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES HYDROLYSATS. 111
III.6.1. Solubilité azotée des hydrolysats. 111
III.6.2. Capacité à retenir l'huile. 111
III.6.3. Capacité moussante et stabilité moussante. 112
III.6.4. Activité émulsifiante et stabilité de l'émulsion. 112

III.7. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES HYDROLYSATS SUR LA CROISSANCE DE CELLULES ANIMALES CULTIVEES DANS UN MILIEU SANS SERUM. 113

CHAPITRE : RESULTATS ET DISCUSSION 115

I. PREPARATION D'ISOLATS PROTEIQUES ET D'HYDROLYSATS FONCTIONNELS A PARTIR DE TOURTEAUX DE COLZA. 115

I.1. INTRODUCTION. 115

I.2. EVALUATION DE DIVERS PROCEDES POUR L'ISOLEMENT DE PROTEINES DE COLZA. 115
I.2.1. Influence des procédés d'isolement sur la pureté et le rendement protéiques des produits intermédiaires et du produit final. 117
I.2.2. Caractérisation des protéines par CLHP-ET. 119
I.2.3. Composition en acides aminés des protéines présentes dans les concentrats. 121
I.2.4. Récapitulatif de la préparation de concentrats par différents procédés. 122

I.3. PREPARATION D'ISOLATS PROTEIQUES. 123
I.3.1. Elimination des polyphénols de la farine avec un solvant éthanol/eau. 125
I.3.2. Extraction basique et précipitation isoélectrique. 126
I.3.2.1. Influence du ratio farine (solvant (p/v) sur l'extraction basique. 126
I.3.2.2. Précipitation isoélectrique des extraits protéiques. 127
I.3.2.3. Dialyse des précipités isoélectriques. 129
I.3.2.4. Caractérisation des précipités isoélectriques. 129
I.3.3. Récupération des protéines des fractions résiduelles. 132
I.3.3.1. Purification des protéines présentes dans la farine résiduelle. 132
I.3.3.2. Purification des protéines présentes dans le surnageant résiduel. 132
** Dialyse du surnageant résiduel. 132*
** Caractérisation du surnageant dialysé. 133*
I.3.4. Récapitulatif de la préparation d'isolats protéiques. 136

I.4. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES ISOLATS ET DE LEURS PRODUITS D'HYDROLYSE. 136
I.4.1. Propriétés fonctionnelles des isolats. 136
I.4.2. Propriétés fonctionnelles d'hydrolysats. 137
I.4.2.1. Solubilité et rétention de l'huile des hydrolysats. 138
I.4.2.2. Propriétés moussantes des hydrolysats. 139
I.4.2.3. Propriétés émulsifiantes des hydrolysats. 139
I.4.3. Récapitulatif des propriétés fonctionnelles des isolats et hydrolysats protéiques. 140

I.5. CONCLUSION. 140

II. COMPARAISON DE L'ACTION HYDROLYTIQUE DE DIFFERENTES PROTEASES. *142*

II.1. INTRODUCTION. **142**

II.2. COMPARAISON DE L'ACTION HYDROLYTIQUE DE DIFFERENTES PROTEASES DANS DES CONDITIONS OPERATOIRES DEFINIES. **143**

II.2.1. Mesure de l'activité protéolytique des différentes enzymes dans des conditions opératoires définies. ***144***

II.2.2. Cinétique d'hydrolyse pour différentes enzymes. ***145***

II.2.3. Caractérisation des hydrolysats. ***149***

II.2.3.1. Distribution de taille moléculaire des hydrolysats. *149*

II.2.3.2. Solubilité azotée et taille moléculaire des peptides solubles. *152*

II.2.3.3. Aminogrammes des hydrolysats complets ou solubles. *154*

II.2.4. Influence des hydrolysats sur la croissance de cellules animales. ***155***

II.2.4.1. Influence du degré d'hydrolyse sur la croissance cellulaire. *155*

II.2.4.2. Influence de la spécificité des protéases. *156*

II.2.4.3. Influence de la concentration en hydrolysat. *158*

II.2.4.4. Comparaison entre un hydrolysat de colza et un hydrolysat commercial de blé. *158*

II.2.4.5. Morphologie des cellules. *159*

II.2.4.6. Influence des hydrolysats en tant que substitut à certains éléments du milieu de base. *161*

II.2.5. Récapitulatif de la comparaison des différentes protéases. ***162***

II.3. COMPARAISON DE L'ACTION HYDROLYTIQUE DES PROTEASES DANS DES CONDITIONS OPTIMALES DE PH ET DE TEMPERATURE. **163**

II.3.1. Zone optimale de pH et de température pour la génération de petits et moyens peptides. ***163***

II.3.2. Détermination du pH optimal et de la température optimale des protéases pour des hydrolyses de longue durée. ***167***

II.3.2.1. Conditions optimales de pH et de températures des enzymes. *167*

II.3.2.2. Caractérisation des hydrolysats par CLHP-ET et CLHP-PI. *168*

II.3.3. Récapitulatif de la comparaison des enzymes dans des conditions optimales de pH et de température. ***171***

II.4. CONCLUSION. **171**

III. ETUDE CINETIQUE ET MODELISATION DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE D'ISOLATS DE PROTEINES DE COLZA. *173*

III.1. INTRODUCTION. **173**

III.2. INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES SUR L'HYDROLYSE DE PROTEINES DE COLZA. **173**

III.2.1. Influence des conditions opératoires sur la cinétique d'hydrolyse. ***173***

III.2.1.1. Influence de Eo et de So. *173*

III.2.1.2. Influence de la température. *177*

** Influence de la température sur les cinétiques d'hydrolyse.* *177*

** Energie d'activation des enzymes.* *178*

** Energie d'activation de dénaturation des enzymes.* *179*

III.2.1.3. Influence du pH. *181*

** Calibration de la méthode du pH-Stat avec la méthode au TNBS.* *181*

** Influence du pH sur les cinétiques d'hydrolyse.* *182*

** Influence du pH sur les constantes cinétiques.* *183*

III.2.2. Influence des conditions opératoires sur la nature des peptides générés. ***184***

III.2.2.1. Influence de So, de Eo et de T. *184*

** Influence de So, de Eo et de T sur la répartition de taille des peptides.* *184*

** Influence de Eo, de So et de T sur le caractère hydrophobe des peptides.* *187*

** Influence de Eo, de So et de T sur la composition en peptides < 1000 Da.* *190*

III.2.2.2. Influence du pH sur les systèmes enzyme/Globulines. *191*

III.2.3. Récapitulatif de l'influence des paramètres opératoires sur la cinétique d'hydrolyse et la nature des peptides produits. ***194***

III.3. MODELISATION DES CINETIQUES D'HYDROLYSE. 195
III.3.1. Mise en évidence des phénomènes impliqués dans la protéolyse enzymatique. 195
III.3.1.1. Nombre maximal de liaisons peptidiques clivables. 195
III.3.1.2. Inhibition des enzymes par excès de substrat et évolution de la nature du substrat au cours de l'hydrolyse. 195
III.3.1.3. Inhibition enzymatique par les produits « finaux » de l'hydrolyse. 197
III.3.1.4. Inactivation des enzymes au cours de l'hydrolyse. 198
** Remplacement de l'enzyme par de l'enzyme fraîche. 198*
** Test de Selwyn. 200*
** Solubilisation des enzymes seules dans les conditions d'hydrolyse. 201*
III.3.1.5. Conclusion sur les phénomènes impliqués dans la protéolyse. 203
III.3.2. Modélisation phénoménologique des cinétiques d'hydrolyse. 204
III.3.2.1. Cinétiques d'hydrolyse. 205
III.3.2.2. Expressions et valeurs de k_2 et de Km_R. 206
III.3.2.3. Inactivation des enzymes. 207
** Inactivation de l'Alcalase 2,4L. 207*
** Inactivation de la Pronase SG. 208*
III.3.2.4. Identification paramétrique. 208

III.4. CONCLUSION. 213

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES. 215

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. 219

ABREVIATIONS.

ACE	: angiotensin I - converting enzyme
AMC	: amino-méthyl-coumarine
ACN	: acétonitrile
AMSOL	: association de l'industrie des semence de plantes oléoprotéagineuses
AP	: activité protéolytique
APS	: persulfate d'ammonium
BAEE	: Nαbenzoyl-L-arginine éthyl-ester
BHK	: ovaire de bébé hamster
CHO	: ovaire d'hamster chinois
CLHP	: chromatographie liquide haute performance
CLHP-ET	: chromatographie liquide haute performance d'exclusion de taille
CLHP-EI	: chromatographie liquide haute performance d'échange d'ions
CLHP-PI	: chromatographie liquide haute performance en phase inverse
DF	: diafiltration
DH	: degré d'hydrolyse
DHt	: degré d'hydrolyse à un temps donné
E	: enzyme
E_A	: enzyme active
E_AS_R	: complexe enzyme-substrat hydrolysable
Ea	: enzyme active ou énergie d'activation (selon le contexte)
EC	: électrophorèse capillaire
Ed	: enzyme dénaturée ou énergie d'activation de dénaturation (selon le contexte)
EDTA	: acide éthylène diamine trétraacétique
EI	: complexe enzyme-inhibiteur
ES	: complexe enzyme-substrat
ESB	: encéphalopathie spongiforme bovine
ESI	: ionisation par électrospray
ESS	: complexe enzyme-substrat-substrat
Eo	: concentration initiale en enzyme
Ei	: enzyme inactivée
FAO	: food and agricultural organization
FMOC	: 9-fluorenylmethyl chloroformate
f_N	: facteur de conversion Kjeldahl
I	: inhibiteur d'enzyme
IH	: indice d'hydrophobie
ind.	: indéterminé
MM	: masse molaire
Mp	: masse de protéine
MPV	: matière protéique végétale
MS	: matière sèche
$M+H^+$	: molécule cationisée d'un proton dans la source du spectromètre de masse
n.c.	: non caractérisé
n.d.	: non déterminé
OPA	: orthophtaldialdéhyde
P	: produit
pHo	: pH optimal
pI	: point isoélectrique
PMSF	: fluorure de phényl méthane sulfanyl
PROLEA	: filière française des huiles et protéines végétales
PVPP	: polyvinyl polypyrrolidone
REP	: ratio d'efficacité protéique

Abréviations

Rdt	: rendement protéique
RSM	: response surface methodology
S	: substrat
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SHMP	: hexamétaphosphate de sodium
SM	: spectrométrie de masse
So	: concentration initiale en protéines
S_R	: substrat « hydrolysable »
T	: température
To	: température optimale
TAME	: p-toluènesulfonyl-L-arginine méthyl-ester
TCA	: acide trichloroacétique
TEMED	: NNN'N'-tétraméthyl éthylène diamine
TFA	: acide trifluoroacétique
TM	: taille moléculaire
TNBS	: acide trinitrobenzène sulfonique
TIB	: transferrine, insuline, albumine
tr	: temps de rétention
UA	: unité Anson
UF	: ultrafiltration
U_{TCA}	: unité arbitraire d'activité protéolytique (définie dans ce travail)
UV	: ultra-violet
Vero	: rein de singe vert
VIH	: virus d'immunodéficience humaine
3-MPA	: acide 3-mercaptopropionique

Abréviation des acides aminés :

	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V
Acide aspartique + Asparagine	Asx	-
Acide glutamique + Glutamine	Glx	-
N'importe quel acide aminé	Xaa	-

NOMENCLATURE.

a et b : coefficients
A : coefficient d'équivalence entre S_R et V_{NaOH} (g/L.mL)
B : coefficient de proportionnalité entre DH et V_{NaOH}
DH : degré d'hydrolyse déterminé par la méthode du pH-Stat (%)
DH_{lim} : degré d'hydrolyse maximal pouvant être atteint (DH limite) (%)
DHt : degré d'hydrolyse à un temps donné t (%)
DH_{TCA} : degré d'hydrolyse déterminé par la méthode au TCA (%)
DH_{TNBS} : degré d'hydrolyse déterminé par la méthode au TNBS (%)
DH_{5mn} : degré d'hydrolyse obtenu à 5 mn (%)
E ou E_t : concentration totale d'enzyme active (mL/L ou g/L)
E_A : concentration d'enzyme active libre (mL/L ou g/L)
Ea : énergie d'activation (J/mol) ou concentration d'enzyme active (g/L) (selon le contexte)
E_AS_R : concentration en complexe enzyme-substrat hydrolysable (g/L)
Ed : énergie d'activation de dénaturation (J/mol)
Eo : concentration initiale en enzyme (mL/L ou g/L)
Eo/So : ratio enzyme/substrat (%)
$E_1(0)$: concentration initiale de l'enzyme n° 1 de l'Alcalase 2,4L (mL/L)
$E_2(0)$: concentration initiale de l'enzyme n° 2 de l'Alcalase 2,4L (mL/L)
E_1 : concentration de l'enzyme active n° 1 de l'Alcalase 2,4L (mL/L)
E_2 : concentration de l'enzyme active n° 2 de l'Alcalase 2,4L (mL/L)
h : nombre de liaisons peptidiques clivées (méqv/g protéines)
h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques (méqv/g protéines)
J : critère de type moindre carré
J_{opt} : critère de type moindre carré optimisé
k : constante de vitesse ($temps^{-1}$)
k_o : constante de vitesse initiale ($temps^{-1}$)
k_d : constante de dénaturation (mn^{-1} ou h^{-1})
k_{dmoy} : constante de dénaturation moyenne de l'Alcalase (mn^{-1} ou h^{-1})
k_{do} : constante d'Arrhénius de dénaturation (mn^{-1} ou h^{-1})
k_i : constante d'inactivation (L/mL.mn)
ki_1 : constante d'inactivation de l'enzyme n° 1 de l'Alcalase 2,4L (L/mL.mn)
ki_2 : constante d'inactivation de l'enzyme n° 2 de l'Alcalase 2,4L (L/mL.mn)
k_1, k_{-1}, k_2 : constantes de vitesse (h^{-1})
k_2/Km : efficacité catalytique (déterminé à partir du DH) (L/g.h)
k_{2TNBS}/Km_{TNBS} : efficacité catalytique (déterminé à partir du DH_{TNBS}) (L/g.h)
Km : constante de Michaelis-Menten apparente (déterminée à partir du DH) (g/L)
Km* : Km au cours de l'hydrolyse (g/L)
Kmi : constante de Michaelis-Menten apparente en présence d'inhibiteur (g/L)
Km_{TNBS} : constante de Michaelis-Menten apparente (déterminée à partir du DH_{TNBS}) (g/L)
Km_R : constante de Michaelis-Menten apparente définie par rapport à S_R
N_b : normalité de la base (mol)
R : constante des gaz parfaits (J/mol.K)
r_i : vitesse d'inactivation de l'enzyme (mL/L.mn)
So : concentration initiale en protéines (g/L)
$So_{hydrolysat}$: concentration initiale en hydrolysat (g/L)
T : température (°K ou °C)
Vo : vitesse initiale (g/L.h)
V_{NaOH} : volume de soude (mL)
Vm : vitesse maximale apparente (déterminée à partir du DH) (g/L.h)
Vm* : Vm au cours de l'hydrolyse (g/L.h)
Vmi : vitesse maximale apparente en présence d'inhibiteur (g/L.h)
Vm_{TNBS} : vitesse maximale apparente (déterminée à partir du DH_{TNBS}) (g/L.h)
Vm_R : vitesse maximale apparente définie par rapport à S_R (g/L.h)
Vol : volume du mélange réactionnel (mL)
α ou alpha : coefficient moyen de dissociation des groupements α-aminés
Ω : fraction de l'enzyme n° 1 (%)
θ : fraction des protéases qui s'autolysent dans la Pronase SG (%)

INTRODUCTION GENERALE.

Liées à une forte demande en huile végétale, les cultures de colza n'ont cessé d'augmenter depuis une vingtaine d'années, entraînant alors une production croissante du résidu de l'extraction de l'huile des graines de colza, appelé tourteau. Ce dernier, relativement riche en protéines (teneur d'environ 40 %), est principalement utilisé dans l'alimentation animale mais, contrairement au soja, il est peu utilisé par les industriels pour l'élaboration de produits à usages alimentaire ou nutraceutique ; ceci s'explique par le fait que, d'une part, les protéines de tourteaux de colza ne possèdent pas de propriétés fonctionnelles satisfaisantes pour leur utilisation en tant qu'ingrédients dans l'alimentation humaine (Vioque *et al.*, 2000) et que, d'autre part, ces dernières sont associées à des composés antinutritionnels tels que des polyphénols, de l'acide phytique, des glucosinolates et des inhibiteurs protéasiques qui sont difficiles à éliminer et qui altèrent les caractéristiques nutritionnelles, fonctionnelles ou organoleptiques du produit final (Schwenke, 1994 ; Xu et Diosady, 2002).

Le tourteau de colza présente toutefois certains avantages par rapport aux autres sources protéiques. Comparativement aux protéines animales, elles sont beaucoup moins onéreuses, largement disponibles et sans risque de transmission d'agents pathogènes à l'encontre de l'Homme, et, comparativement aux protéines d'origine végétale, le colza n'est pas encore, en Europe, une plante génétiquement modifiée et ses protéines sont caractérisées par une composition équilibrée en acides aminés leur conférant une excellente valeur nutritionnelle (Jeejeebhoy, 2000).

L'une des alternatives pour valoriser les protéines de tourteaux de colza est de les hydrolyser enzymatiquement afin d'obtenir des peptides à haute valeur ajoutée. En effet, certains peptides sont dotés de propriétés fonctionnelles ou d'activités biologiques qui intéressent les industries agroalimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques (Vioque *et al.*, 1999, 2000 ; Pedroche *et al.*, 2004 ; Mar Yust *et al.*, 2004 ; Marczak *et al.*, 2003 ; Deparis *et al.*, 2003 ; Aluko et McIntosh, 2005). Entre autres, il peut s'agir de peptides aux activités antithrombotique ou antihypertensive (impliqués dans le système cardiovasculaire), opioïde (impliqués dans le système nerveux central), antimicrobienne ou antivirale (impliqués dans le système immunitaire) (Silva et Malcata, 2004 ; Adermann *et al.*, 2004).

Cependant, quelles que soient leurs applications potentielles, les mélanges peptidiques doivent être exempts de molécules antinutritionnelles. En effet, ces dernières sont susceptibles

de dégrader les propriétés d'intérêt des peptides et d'avoir des conséquences néfastes sur la physiologie humaine (Godon, 1996). De plus, de par leur interaction avec les protéines et les protéases, ces constituants peuvent diminuer l'activité protéolytique des enzymes et empêcher le clivage de certaines liaisons peptidiques, provoquant, alors, une diminution du taux d'hydrolyse (Clemente, 2000 ; Rohn *et al.*, 2002 ; Nacer *et al.*, 2004 ; Gonçalves *et al.*, 1997 ; Vioque *et al.*, 2001). Enfin, ces composés antinutritionnels possèdent une taille moléculaire du même ordre de grandeur que celle des peptides d'où la difficulté de les éliminer du mélange peptidique (Franěk, 2000).

Ainsi, la première partie de ce travail de thèse sera consacrée, avant de procéder à l'hydrolyse, à établir un procédé pour une élimination maximale des composés non-protéiques d'une farine de tourteaux de colza, l'objectif étant d'obtenir des isolats protéiques (pureté protéique > 90 %). Plusieurs procédés de purification de la farine de colza seront alors comparés selon des critères de performance (rendement, pureté protéique). Le procédé le plus intéressant sera alors optimisé. Les isolats protéiques produits seront caractérisés et constitueront les substrats pour la génération, par voie enzymatique, d'hydrolysats à propriétés fonctionnelles ou à activités biologiques.

Contrairement à la synthèse chimique des peptides à partir d'acides aminés ou à la protéolyse chimique de protéines, la protéolyse enzymatique est économique, non dangereuse, non polluante et ne provoque pas une dégradation ou une racémisation des acides aminés (Gill *et al.*, 1996 ; Maldonado *et al.*, 1998). Toutefois, pour un système enzyme-substrat donné, l'hydrolyse enzymatique doit permettre la libération de peptides biologiquement actifs initialement présents dans la protéine ou permettre la génération d'un mélange de peptides aux propriétés physico-chimiques lui conférant des propriétés fonctionnelles ciblées (Pihlanto-Leppälä, 2001 ; Smyth et FitzGerald, 1998 ; Lahl et Braun, 1994). Or, la génération de tels peptides ou de tels hydrolysats est dépendante de la nature du substrat et de la spécificité de la protéase utilisées (Mahmoud, 1994). En effet, la potentialité de retrouver une séquence peptidique active dépend de la séquence de la protéine initiale, et la capacité des protéases à hydrolyser un substrat donné dépend de sa spécificité (nombre et localisation des ponts peptidiques clivables) (Panyam et Kilara, 1996).

Dans ce contexte, l'un des objectifs de la seconde partie de ce travail de thèse sera d'évaluer les potentialités de plusieurs protéases commerciales de spécificité et de nature différentes à générer des peptides actifs. Pour cela, les protéases seront comparées selon leur efficacité à hydrolyser les isolats protéiques, et selon la nature et l'activité

biologique des peptides qu'elles permettent de générer. Parmi les nombreuses activités biologiques potentielles des peptides, l'expérimentation reposera sur l'influence des peptides sur la croissance de cellules animales cultivées dans un milieu sans sérum. En effet, les peptides peuvent être valorisés en tant que substitut au sérum de veau fœtal dans les milieux de culture de cellules animales. Le sérum de veau fœtal, qui est un produit cher, est un mélange extrêmement complexe constitué, entre autres, de molécules activatrices et inhibitrices de la croissance cellulaire. Cependant, sa composition est très variable d'un lot à l'autre et son emploi est biologiquement risqué puisqu'il peut être à l'origine de l'introduction dans le milieu de contaminants infectieux (mycoplasmes), de virus (VIH ou Hépatite B) ou de prions (ESB) (Kunst, 2000). Afin de réduire ce risque et d'augmenter la sécurité biologique des préparations médicales, il serait possible de remplacer, une partie, voire la totalité du sérum par des peptides d'origine végétale (Franěk, 2000 ; Blom *et al.*, 1996 ; Kunst, 2000).
La démarche suivie pour la sélection des enzymes sera la suivante.

- pour chaque enzyme, plusieurs hydrolysats composés de peptides aux caractéristiques physico-chimiques différentes (séquence en acides aminés, taille, rapport hydrophilie / hydrophobie) seront produits ;
- le type de peptides capables de promouvoir la croissance de cellules animales cultivées dans un milieu sans sérum sera identifié ;
- les deux protéases les plus actives pour la génération des peptides précédents et les plus productrices de ce type de peptides seront alors sélectionnées.

Pour un système enzyme/substrat donné, les conditions d'hydrolyse tels le pH, la température, le ratio enzyme/substrat et la durée sont les principaux paramètres opératoires influençant les propriétés moléculaires des peptides générés. **L'objectif de la troisième partie de ce travail sera de pouvoir prédire le comportement de l'hydrolyse des isolats de protéines en fonction des conditions opératoires de l'hydrolyse.** La démarche suivie sera la suivante.

- Dans une première phase, l'influence des paramètres opératoires de l'hydrolyse sur la cinétique d'hydrolyse et sur la nature des peptides produits (taille, caractère hydrophobe) sera déterminée. La ou les relations entre l'étendue de l'hydrolyse et la nature des peptides produits seront mises en évidence.
- La seconde phase aura pour but de modéliser les cinétiques d'hydrolyse obtenues en réacteur discontinu par une approche phénoménologique basée sur le schéma réactionnel de Michaelis-Menten. Pour la construction du modèle, les phénomènes impliqués dans le processus d'hydrolyse seront mis en évidence.

I. LE COLZA, SON TOURTEAU ET SES PROTEINES.

I.1. LE COLZA.

I.1.1. Généralités.

Le colza (*Brassica napus L.*), plante à fleurs jaunes appartenant à la famille des crucifères, est un hybride naturel du chou (*Brassica oleracea L.*) et de la navette (*Brassica campestris L.*). Cultivé depuis l'antiquité, sa culture s'étend aujourd'hui dans de nombreux pays aux climats tempérés. Il existe, dans le monde, plus de 3000 variétés de colza mais seulement deux d'entre elles sont majoritairement cultivées : le colza d'hiver particulièrement présent en Europe et le colza de printemps essentiellement retrouvé au Canada sous le nom de « canola » (CANada Oil Low Acid).

De par sa teneur relative protéine-amidon-lipide, le colza entre dans la catégorie des oléagineux au même titre que le soja, le coton, le tournesol et l'arachide. Comme montré dans la figure B.I.1, les oléagineux se distinguent des céréales (blé, maïs, avoine, orge, sorgho…) ou des légumineuses (pois, féverole, lupin…) par une teneur élevée en huile, par leur absence d'amidon et par une teneur plus élevée en composés divers (glucides solubles, minéraux, composés azotés non protéiques et composés antinutritionnels) (Godon, 1996). Ainsi, comme la plupart des oléagineux, le colza est cultivé pour l'huile de ses graines (teneur comprise entre 35 et 50 %) dont les applications sont essentiellement alimentaires.

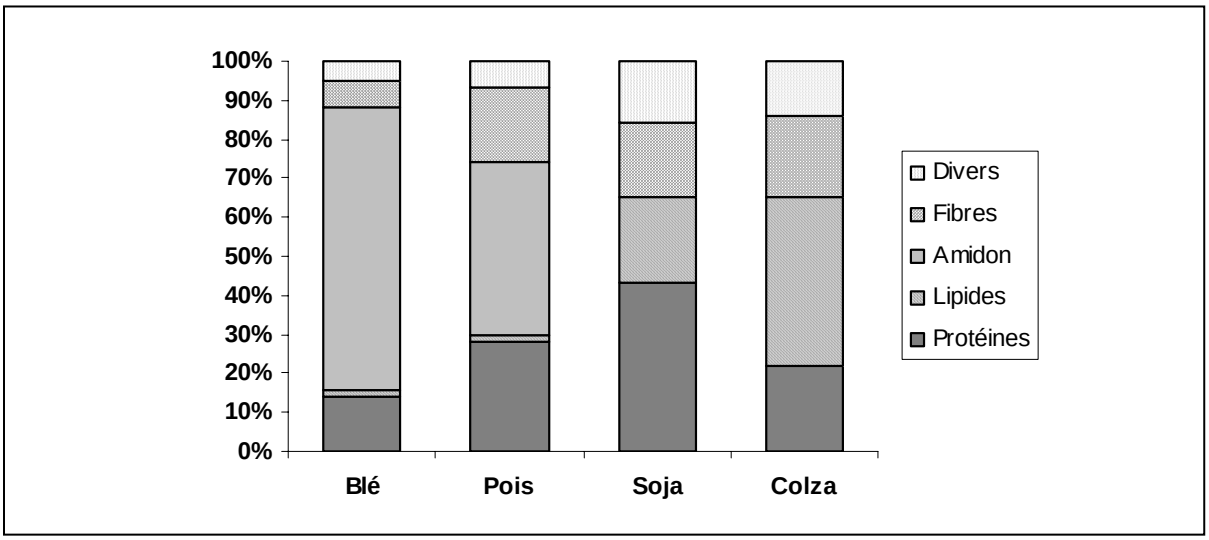


Figure B.I.1 : composition globale de différentes graines (extrait de Godon, 1996).

I.1.2. Production de graines et d'huile de colza.

L'huile de colza est principalement utilisée dans l'alimentation humaine pour la production industrielle de margarines, de sauces, de condiments et de certains produits intermédiaires (farines, pâtes,…). Depuis 1999, elle est même la première huile consommée en France. Toutefois, contrairement aux Canadiens qui ont une vision « diététique » de l'huile de canola et malgré sa haute qualité nutritionnelle, elle est peu utilisée par les ménages français qui préfèrent l'huile de tournesol ou d'olive (Godon, 1996 ; Info-PROLEA 61, 2003).
L'huile de colza est également valorisée dans des usages non alimentaires. En substitution aux ressources fossiles, elle constitue une ressource « énergétique » renouvelable, biodégradable et respectueuse de l'environnement. En effet, en France, l'huile de colza est utilisée pour produire un biocarburant, un ester méthylique appelé Diester® (contraction de diesel et ester), incorporable jusqu'à 30 % au gazole vendu à la pompe (2 % pour les voitures). Environ 300 milles tonnes d'huile de colza sont destinées à cet usage et le ministère français, soucieux de répondre aux accords de Kyoto, prévoit de valoriser cette voie écologique en triplant sa production d'ici à 2007. De nombreux produits à base d'acide érucide provenant de l'huile de colza ont aussi vu le jour tels que des bio-lubrifiants, des peintures, des vernis, des encres, des produits cosmétiques, des plastiques, des revêtements ou des détergents. Ceci est dû au fait que l'acide érucique est un acide gras de formule (C 22 : 1) dont les caractéristiques sont assez proches des molécules issues de l'industrie pétrolière (Info-PROLEA 58, 2002).

Au troisième rang derrière l'huile de soja et de palme, l'huile de colza constitue 14 % de la production mondiale d'huile. Depuis 1995, la production française d'huile de colza se situe autour de 0,6 million de tonnes.
Liée à une augmentation régulière de la consommation d'huiles végétales, la production d'oléagineux en Europe a été multipliée par quatre en 25 ans, en passant de 3 millions de tonnes en 1980/1981 à 13 millions de tonnes en 2003/2004 ; le colza représentant, en 2004, 75 % de cette production. La France est le deuxième producteur de colza avec 3,3 millions de tonnes derrière l'Allemagne (3,6 millions de tonnes).

I.1.3. Sélections et modifications génétiques du colza.

L'augmentation de la production de graines oléagineuses a été possible, d'une part, grâce à l'augmentation des surfaces cultivées et, d'autre part, grâce aux travaux de sélection

génétique. Ces derniers ont permis de cultiver des variétés d'oléagineux plus résistantes aux maladies (principalement le phoma) et plus riches en huile d'où une amélioration significative des rendements (progression annuelle moyenne de 2,5 % depuis 10 ans) (AMSOL, 2001).
Le colza cultivé de nos jours a été sélectionné dans les années 70/80 afin que ses graines soient exemptes en acide érucique, acide gras favorisant les maladies cardio-vasculaires et cancérogène, et quasi-exemptes en glucosinolates (10 – 15 µmoles/g de graine), composés soufrés responsables de problèmes d'inappétence et de désordres physiologiques chez les monogastriques (Lee *et al.*, 1984). Cette variété de colza est appelée double 0 en opposition aux variétés dîtes double + contenant acide érucique et glucosinolates.

Les travaux de modifications génétiques réalisés sur les plantes sont généralement entrepris afin d'obtenir des graines de composition plus stable et correspondant mieux aux besoins des industriels et/ou du consommateur. Pour le colza, les généticiens travaillent aujourd'hui sur sa résistance par rapport aux maladies, herbicides et insectes, sur la composition lipidique de ses graines selon l'usage spécifique destiné à l'huile (alimentaire ou non alimentaire) et sur la composition protéique de ses graines (AMSOL, 2001 ; CETIOM 44, 1998 ; Leckband *et al.*, 2002). Bien que des colzas génétiquement modifiés soient déjà cultivés depuis 1995 au Canada et aux Etats-Unis, la France étudie l'impact des organismes génétiquement modifiés sur l'environnement et interdit, par principe de précaution, leur commercialisation (Murphy, 1996).

I.1.4. Procédé d'extraction de l'huile des graines.

La figure B.I.2 présente le procédé classique de transformation des graines de colza en huile raffinée. Ce procédé est divisé en trois étapes principales : la trituration des graines, l'extraction de l'huile résiduelle et le raffinage de l'huile. La trituration permet de récupérer après aplatissage des graines, cuisson des flocons obtenus et pression des flocons séchés, d'une part, l'huile brute de pression, et d'autre part, un tourteau dit « gras » car non totalement déshuilé (les écailles de presse contiennent encore 12 à 15 % d'huile). La récupération de l'huile résiduelle du tourteau gras est effectuée en deux étapes. Il est d'abord réalisé une extraction chimique du tourteau gras avec un solvant apolaire de qualité alimentaire, l'hexane, dans lequel l'huile est miscible. Il se forme alors un mélange solvant-huile appelé miscella. Par distillation de ce miscella, l'huile résiduelle, dite d'extraction, est récupérée. Les huiles de pression et d'extraction sont alors raffinées (réduction des pesticides,

neutralisation du goût, décoloration et désodorisation) afin d'éliminer les impuretés et améliorer les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'huile (Baudet, 1988). Ces étapes conduisent aussi à la production d'un co-produit, un tourteau déshuilé contenant approximativement 3 % d'huile. Ce tourteau est désolvaté à la vapeur pour être commercialisable. Le solvant est recyclé.

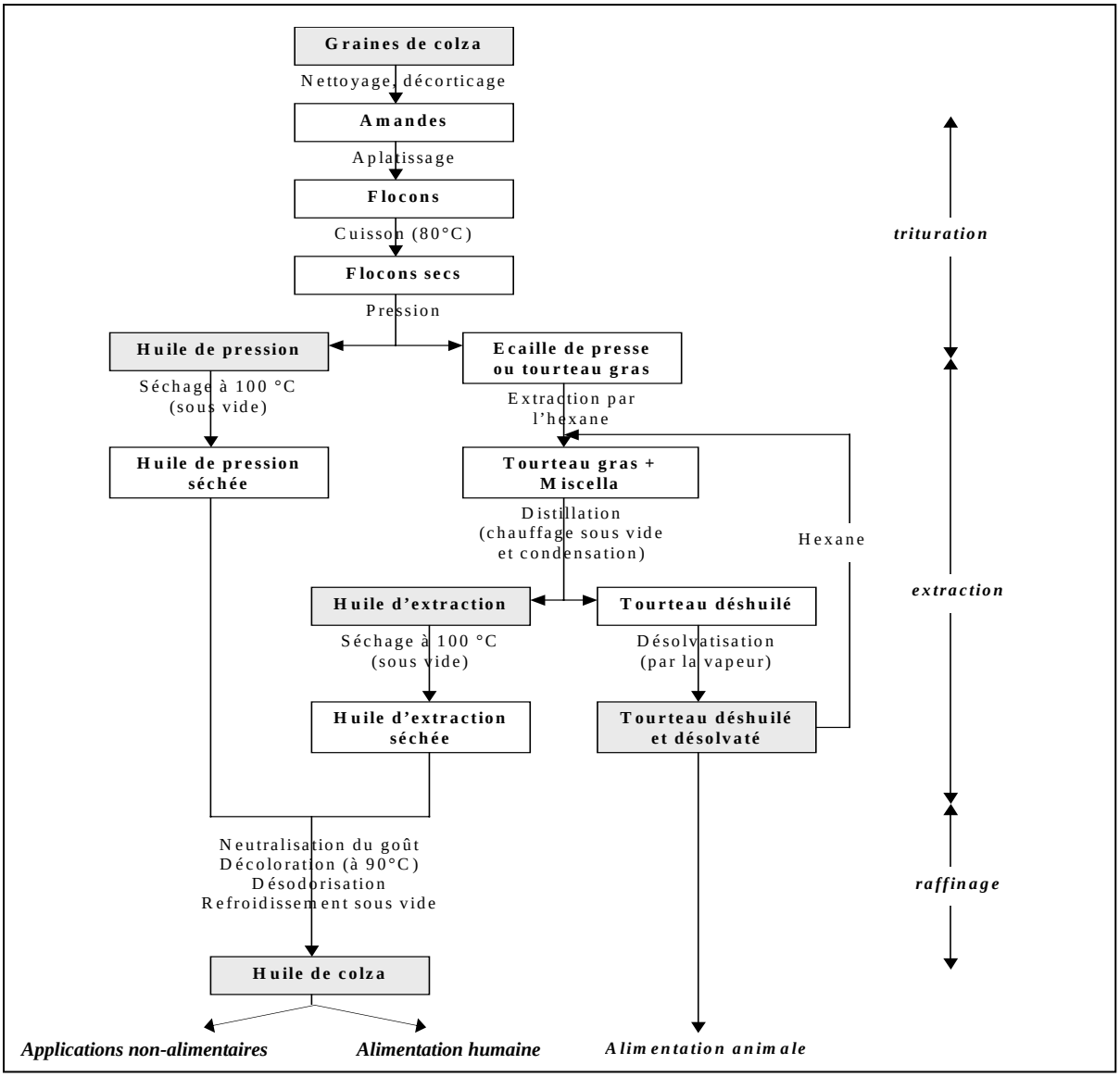


Figure B.I.2 : schéma du procédé de production de l'huile et du tourteau de colza.

La production d'huiles alimentaires ou non alimentaires constitue le principal débouché du colza cultivé. Cependant, comme souligné par Godon (1996), l'avenir économique d'un produit dépend de ses caractéristiques propres mais également du sort qui est réservé à la commercialisation de ses co-produits. Ainsi, la valorisation du tourteau de colza est un enjeu majeur pour le développement des cultures de colza.

I.2. LE TOURTEAU DE COLZA.

I.2.1. Une matière première riche en protéines.

Le tourteau de colza est une matière végétale relativement riche en protéines. En effet, celui-ci renferme la quasi-totalité des protéines de la graine dont la teneur est comprise entre 21 et 24 %, N × 6,25), celles-ci se retrouvant simplement concentrées (Godon, 1996). C'est une matière première peu onéreuse puisque son prix sur le marché fluctue entre 0,12 et 1,18 €/kg. C'est pourquoi, ce co-produit est essentiellement destiné à l'alimentation des animaux d'élevage.

Le tourteau de colza fait partie des matières protéiques végétales (MPV) définies comme étant « des produits alimentaires obtenus à partir d'oléagineux, de légumineuses ou de céréales par une réduction ou une élimination de certains des principaux constituants non protéiques, de manière à obtenir une teneur protéique (N × 6,25) de 40 % ou plus ; cette valeur étant calculée sur sec ». Plus précisément, le tourteau de colza est une farine végétale, MPV dont la teneur en protéines est comprise entre 40 et 65 % (sur la base de la matière sèche). Toutefois, la farine de tourteaux de colza possède une teneur en protéines comprise entre 30 et 45 %.

Les farines de tourteaux de colza sont majoritairement composées de fibres (30 – 55 %), de protéines mais elles contiennent également des lipides résiduels (≈ 3 %), des sucres solubles (≈ 7 %), des minéraux (≈ 8 %) et des petites molécules non-protéiques appelées composés antinutritionnels (glucosinolates, composés phénoliques et acide phytique) (≈ 5 %) (tableau B.I.1.). Il existe une certaine variabilité de la composition des farines de tourteaux de colza essentiellement due à une différence de la variété de colza utilisée, des conditions de culture et du climat (Schwenke, 1994).

Tableau B.I.1 : composition chimique de farines de tourteaux de colza (% sur la base de la matière sèche). (-) : non déterminé.

	Farine de tourteaux			
Référence	Gonçalves *et al.* (1997)	Klockeman *et al.* (1997)	Rozan (1997)	Vioque *et al.* (2000)
Protéines (N × 6,25)	31,4	32,1	41,6	40,4
Azote non protéique	0,6	-	0,2	-
Lipides	4,3	4,4	2,1	3,9
Fibres	29,5	55,4	35,7	37,9
Cendres	7,0	8,2	6,5	9,0
Acide phytique	-	-	2,0	-
Polyphénols	2,0	-	1,3	2,6
Sucres solubles	4,9	-	10,0	6,3
Glucosinolates	-	-	0,6	-

I.2.2. Les protéines de la graine de colza.

I.2.2.1. Les différents types de protéines.

La fraction protéique des graines de colza est majoritairement constituée de deux familles de protéines, les globulines et les albumines. La fraction albumine est assez hétérogène. En effet, essentiellement composée d'une protéine de réserve de type 2S, la napine, cette fraction rassemble également la plupart des protéines ayant un rôle physiologique dans la graine (protéases, lipoxygénases…). Les globulines, représentées par la cruciférine, une protéine de type 12S, ont uniquement un rôle de réserve en carbone et en azote mobilisables par la plante au moment de la germination.

Comme montré dans le tableau B.I.2, la proportion entre globulines et albumines est très variable selon la variété de colza considérée (Raab *et al.*, 1992). La teneur élevée en albumines des graines de colza constitue néanmoins une particularité par rapport aux autres oléagineux comme le soja (Godon, 1996).

Tableau B.I.2 : proportion relative des différentes classes de protéines de graines de colza et de soja (Raab *et al.*, 1992 ; Godon, 1996 ; Gonçalves *et al.*, 1997).

	albumines	globulines	autres
Soja (*Glycine max L.*) (Godon, 1996)	10	90	-
Colza (*Brassica napus L.*) (Raab *et al.*, 1992)	13,4 – 46,1	26,5 – 65,3	15
Colza (*Brassica napus L.*) (Gonçalves *et al.*, 1997)	49,4	31,6	19

I.2.2.2. Valeur nutritionnelle des protéines de tourteaux de colza.

Parmi les protéines végétales, les protéines de colza, et de manière plus générale, celles d'oléagineux, ont une place à part en ce sens que la proportion de leurs acides aminés est répartie de façon équilibrée (Jeejeebhoy, 2000). Ainsi, les protéines d'oléagineux possèdent une valeur nutritionnelle supérieure aux autres protéines végétales et rivalisent même avec les protéines animales (blanc d'œuf ou viande de bœuf) connues pour leur excellente qualité nutritionnelle (tableau B.I.3.A) (Friedman, 1996 ; Rozan *et al.*, 1997).

Dans l'ensemble, les protéines de colza sont riches en lysine et leur teneur en tryptophane est satisfaisante (Godon, 1996). Elles possèdent une composition en acides aminés en adéquation avec celle recommandée par la FAO pour les adultes et les enfants (tableau B.I.3.B). Toutefois, la différence du rôle physiologique des fractions albumines et globulines dans la graine se traduit par des différences importantes de leur composition en acides aminés (tableau B.I.3.C). La particularité des albumines est de présenter des teneurs élevées en acides

aminés soufrés, en lysine et en acides aminés sous forme d'amide. Les globulines ont une composition caractéristique des protéines de réserve puisqu'elles sont riches en acides aspartique et glutamique (et leurs amides) et en arginine (Schwenke *et al.*, 1981).

Tableau B.I.3.A : classement de régime de différentes protéines suivant leur ratio d'efficacité protéique, REP (Friedman, 1996, sauf * : Rozan *et al.*, 1997). REP = (gain de poids pour un groupe testé) / (quantité de protéines totales consommées). REP < 1,5 : protéines aux qualités nutritionnelles faibles ; 1,5 ≤ REP < 2 : protéines de qualité nutritionnelle intermédiaire ; REP ≥ 2 : protéines de haute qualité nutritionnelle.

Régime	**REP**
Blanc d'oeuf	3,71
Viande de bœuf hachée	3,36
Concentrat de protéines de colza	3,29
Caséine (lait de vache)	3,13
Farine de tourteaux de colza*	1,90
Protéines de soja	1,60
Farine de pois	1,56
Farine de blé	0,95

Tableau B.I.3.C : proportion, en %, des acides aminés constituant les globulines ou les albumines (Simard *et al.*, 1977, extrait de Godon, 1996).

Acides aminés	**Globulines**	**Albumines**
Asp	8,6	6,8
Thr	2,5	3,7
Ser	3,5	5,8
Glu	20,0	19,8
Pro	6,2	7,7
Gly	4,8	4,9
Ala	3,6	4,9
Cys	1,7	n.d.
Val	5,0	3,6
Met	n.d.	n.d.
Ile	5,2	3,9
Leu	9,2	6,9
Tyr	3,1	2,2
Phe	4,8	6,0
Trp	0,5	n.d.
Lys	7,4	13,6
His	3,8	3,9
Arg	10,1	6,3

n.d. : non déterminé.

Tableau B.I.3.B : comparaison entre la quantité en acides aminés recommandés par la FAO/WHO/UNO et celle d'isolats de protéines de colza (Tzeng *et al.*, 1988 ; Vioque *et al.*, 2000 ; Klockeman *et al.*, 1997).

	Recommandation par la FAO			**Isolat de protéines de colza**		
Acide aminé (g / 100 g protéines)	Enfant de 2 à 5 ans	Enfant de 10 à 12 ans	Adulte	Tzeng *et al.* (1988)	Klockeman *et al.* (1997)	Vioque *et al.* (2000)
His	1,9	1,9	1,6	3,2	2,5	2,6
Ile	2,8	2,8	1,3	3,9	3,0	3,8
Leu	6,6	4,4	1,9	7,6	7,5	8,2
Lys	5,8	4,4	1,6	6,3	4,7	4,1
Met + Cys	2,5	2,2	1,7	5,7	2,5	3,3
Phe + Tyr	6,3	2,2	1,9	7,8	7,4	6,6
Thr	3,4	2,8	0,9	4,5	4,1	4,7
Trp	1,1	0,9	0,5	n.d.	n.d.	4,7
Val	3,5	2,5	1,3	4,9	3,8	5,1

n.d. : non déterminé.

Il existe toutefois une hétérogénéité assez importante de la qualité des tourteaux commerciaux probablement due à des conditions de triturations différentes (Jensen *et al.*, 1995). En effet, dans l'industrie huilière, aucun cahier des charges n'est fixé pour les traitements thermiques. Ces derniers sont susceptibles d'être modifiés pour permettre de meilleurs rendements d'extraction de l'huile des graines (CETIOM 36, 1996). Ainsi, la valeur nutritionnelle des

protéines de colza peut être fortement réduite lors de l'étape de désolvantisation de l'hexane (figure B.I.2) (Shires *et al.*, 1981). Selon la sévérité du traitement thermique au cours de cette étape, la destruction et l'indisponibilité de certains acides aminés comme la lysine et l'altération de la digestibilité des protéines sont plus ou moins importantes (Jensen *et al.*, 1995 ; Rozan *et al.*, 1997).

I.2.2.3. La cruciférine.

La cruciférine est une protéine globulaire très compacte de masse moléculaire élevée : 300 à 350 kDa. Cette protéine est, comme la plupart des protéines de type 12S, constituée de six sous-unités organisées en antiprisme trigonal comme schématisé dans la figure B.I.3 (Plietz *et al.*, 1983). Ces sous-unités sont constituées de deux chaînes polypeptidiques de nature physico-chimique différente : une chaîne acide α de 25 – 35 kDa et une chaîne basique β de 23 – 25 kDa, reliées par des ponts disulfures (Schwenke *et al.*, 2000 ; Dalgalarrondo, 1986). Dans le modèle de Plietz (1983), les polypeptides α sont plutôt localisés à la périphérie de la molécule alors que les polypeptides β constituent le cœur hydrophobe de la protéine. Selon les conditions de force ionique et le pH du milieu, les globulines peuvent se dissocier en trimère (7 – 8S) puis en monomère (3S) (Godon, 1996).

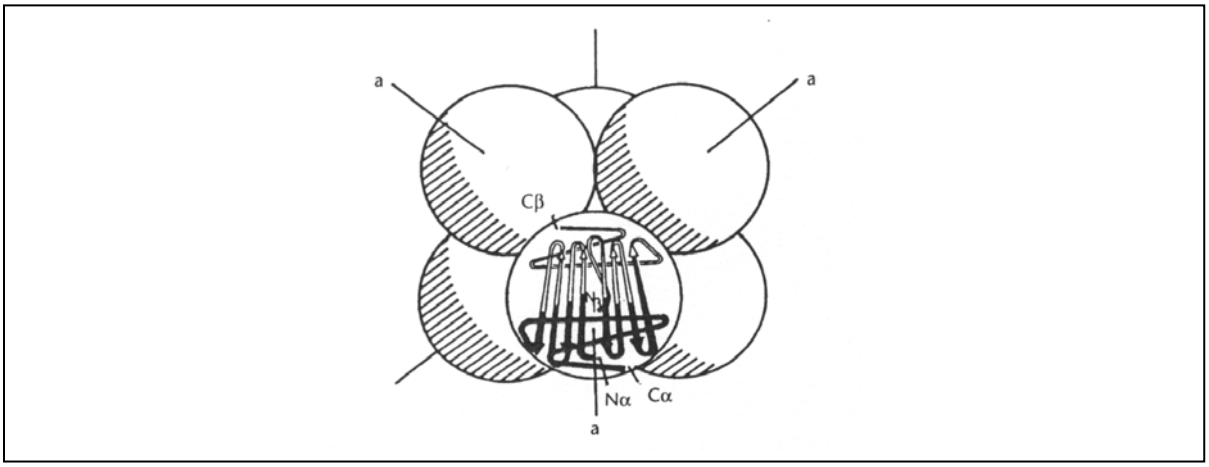


Figure B.I.3 : modèle de la structure quaternaire des protéines de type 12S en antiprisme trigonal tenant compte des arrangements hypothétiques des polypeptides α et β au sein de chaque sous-unité (Plietz *et al.*, 1983, extrait de Godon, 1996).

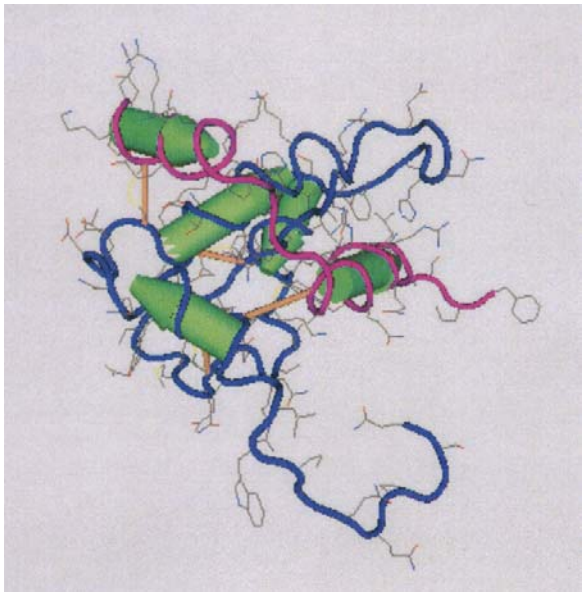
La structure secondaire de la cruciférine est caractérisée par une proportion élevée en feuillet β (30 %) et une proportion moindre en hélice α (10 %) (Schwenke *et al.*, 1980). Sa température de dénaturation est de 80 – 81 °C pour des pH compris entre 6 et 10 (Léger et Arntfield, 1993).

La globuline 12S du colza diffère des globulines de type 11S des autres espèces par son point isoélectrique élevé (7,2 au lieu de 4,5-5 pour les autres globulines) (Schwenke *et al.*, 1981) et par son hydrophobie totale élevée (Schwenke, 1990). Ne possédant pas de sites de glycosylation (Asn-X-Ser/Thr), la cruciférine n'est pas une glycoprotéine (glucides liés < 13 %) (Schwenke *et al.*, 1981). Par contre, elle présente un taux d'amidation élevé (61 % des acides aspartiques et glutamiques) (Schwenke, 1990).

I.2.2.4. Les napines.

Les napines sont des protéines basiques (pI > 10) de petite taille moléculaire, entre 12,5 et 14,5 kDa (Schwenke, 1994). Leur caractère basique est essentiellement lié à l'amidation de leurs acides aminés acides. Elles possèdent un caractère très hydrophile. De plus, la présence de résidus lysine et arginine chargés positivement et localisés en surface leur confère des sites privilégiés d'interactions électrostatiques.

Comme visualisé dans la figure B.I.4, il s'agit d'une protéine riche en hélice α (≈ 50 %) et pauvre en feuillet β (≈ 15 %) (Schwenke *et al.*, 1988 ; Schmidt *et al.*, 2004). Les napines sont constituées de deux chaînes polypeptidiques, une petite chaîne de 4 – 4,5 kDa et une plus grande de 9 – 10 kDa, reliées par deux ponts disulfures (Ericson *et al.*, 1986 ; Monsalve et Rodriguez, 1990 ; Monsalve *et al.*, 1990). Cette structure provient du clivage post-traductionnel d'un précurseur de 21 kDa.



Légende des couleurs :
- violet : petite chaîne (3,8 kDa)
- bleu : grande chaîne (8,4 kDa)
- orange : pont disulfure
- vert : structure en hélice α
- noir : chaîne latérale des acides aminés

Figure B.I.4 : structure tridimensionnelle d'une napine (BnIb) modélisée à partir des travaux de Rico *et al.* (1996).

Grâce à leurs ponts disulfures intra- et interchaînes qui impliquent les huit cystéines de la séquence (figure B.I.4), les napines possèdent une grande stabilité structurale pour des pH compris entre 3 et 12, et une bonne résistance à la température ; sa température moyenne de dénaturation irréversible variant de 60 à 67 °C selon le pH et la force ionique du milieu (Schmidt *et al.*, 2004 ; Folawiyo et Owusu Apenten, 1997).

I.2.2.5. Les oléosines et la myrosinase.

Les oléosines, protéines de taille moléculaire comprise entre 15 – 25 kDa, peuvent représenter jusqu'à 10 % des protéines totales des graines de colza (Murphy *et al.*, 1989). Leur fonction biologique essentielle semble être une stabilisation des globules lipidiques constituant les réserves de la graine. Leur point isoélectrique est compris entre 9 et 10 (Bérot *et al.*, 2004).
Une autre protéine importante du colza est la myrosinase (65 – 75 kDa) qui est une thioglucoside glucohydrolase. Elle hydrolyse les glucosinolates en isothiocyanates et oxazolidinethiones, molécules responsables de disfonctionnements physiologiques chez les animaux (Sosulski, 1983, extrait de Godon, 1996).

I.2.3. Les composés « antinutritionnels ».

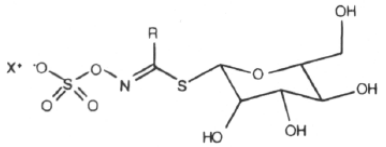
Les graines et tourteaux de colza possèdent divers composés susceptibles de provoquer des réponses physiologiques lors de leur ingestion. Les effets résultants (néfastes ou bénéfiques) dépendent de leur nature, de leur mode d'action et de la dose ingérée (Godon, 1996). Ces différents composés sont pour la plupart issus de voies métaboliques « secondaires ». Ils constituent une défense du règne végétal contre les herbivores et les parasites tels que les insectes ou les microorganismes. Généralement indésirables, ils ont été regroupés sous l'appellation de composés antinutritionnels. Les principaux composés antinutritionnels du colza sont les glucosinolates, l'acide érucique, l'acide phytique et les composés phénoliques (Hill, 1979).

I.2.3.1. Les glucosinolates.

Les glucosinolates représentent entre 0,2 et 2 % de la farine de tourteaux de colza (Yang *et al.*, 1988). Leur structure chimique est représentée dans la figure B.I.5. Selon la nature du

radical –R, il est distingué, chez le colza, une trentaine de glucosinolates différents dont les principaux et leur proportion relative sont récapitulés dans la figure B.I.5. Leur taille moléculaire est comprise entre 390 et 470 Da (Diosady *et al.*, 1984).

Les glucosinolates sont des composés antinutritionnels car leur hydrolyse (enzymatique ou non) génère plusieurs composés toxiques dont les plus dangereux sont des isothiocyanates, l'oxazolidine et des nitriles (Jensen *et al.*, 1995) (figure B.I.5). Ces produits d'hydrolyse provoquent également une altération de la palatabilité (caractéristiques induisant la réaction des sens de l'animal) du tourteau de colza, des phénomènes d'irritation de la bouche, une réduction de la valeur nutritive des protéines suite à leur complexation avec certains acides aminés, l'odeur piquante et le goût âpre caractéristiques du colza (Schwenke, 1994 ; Sosulski et Dabrowski, 1984 ; Mawson *et al.*, 1993).



Nature du radical R	Glucosinolate	Proportion (%)
Méthyl-sulfinyl	Glucoraphanine Glucoalyssine	5,5
Aliphatiques	Progoitrine Napoléiférine Gluconapine Glucobrassicanapine	11,9
3-Indol-ylméthyl	4-Hydroxy-glucobrassicine Glucobrassicine 4-Méthoxy-glucobrassicine Néoglucobrassicine	26,8
Autres	-	55,8

Figure B.I.5 : schéma de l'hydrolyse des glucosinolates par la myrosinase et principaux glucosinolates de tourteaux de colza 00 et leur proportion relative (Nastruzzi *et al.*, 1996 ; Baudet *et al.*, 1988).

I.2.3.2. Les polyphénols.

Le tourteau de colza possède des quantités en polyphénols plus importantes que celles d'autres oléagineux ; leur teneur, qui est cinq à dix fois supérieure à celle du soja, est de l'ordre de 3 % (Naczk *et al.*, 1998 ; Xu et Diosady, 2002).

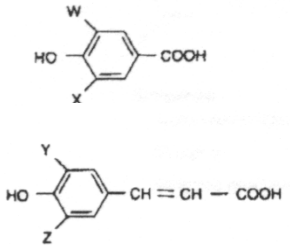
Les principaux composés phénoliques du colza sont les acides phénoliques et les tanins (Xu et Diosady, 2002).

Les acides phénoliques du colza sont présents sous forme libre (teneur d'environ 0,2 %) ou estérifiée (teneur d'environ 1,5 %) (Naczk *et al.*, 1998). Avec une teneur de 1 %, les sinapines

(acides sinapiques estérifiés) sont les principaux constituants phénoliques du colza (Sosulski, 1979). La structure des acides phénoliques et des sinapines est présentée dans la figure B.I.6.

Les tanins sont des composés phénoliques complexes dont la taille moléculaire est comprise entre 500 et 3000 Da. Suivant la méthode de dosage utilisée, leur teneur est comprise entre 0,7 et 3,9 % (Naczk *et al.*, 1998). Deux types de tanins sont différenciés (figure B.I.6) : les tanins hydrolysables qui libèrent, par hydrolyse de leurs liaisons esters, une fraction glucidique et une fraction phénolique, et les tanins condensés qui sont des polymères de molécules élémentaires de type flavonoïde (extrait de Rozan, 1997).

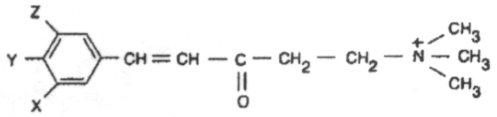
A - Acides phénoliques



Acide	W	X
Protocatécuique	H	OH
Vanillique	OCH_3	H
Syringique	OCH_3	OCH_3
Gallique	OH	OH
p-Hydroxybenzoique	H	H

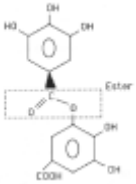
Acide	Y	Z
p-Coumarique	H	H
Caféique	H	OH
Férulique	H	OCH_3
Sinapique	OCH_3	OCH_3

B - Sinapines

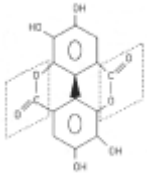


Sinapines	X	Y	Z
protocatécuique	H	OH	H
vanillique	H	OH	OCH_3
Syringique	H	OCH_3	OH
Gallique	OCH_3	OH	OCH_3
p-Hydroxybenzoique	OCH_3	O-Glu	OCH_3

C - Exemples de tanins hydrolysables

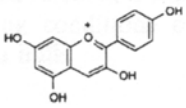


Acide digallique

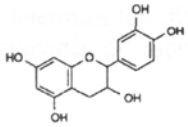


Acide ellagique

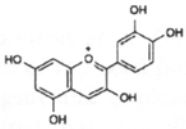
D - Unités de base des tanins condensés



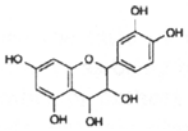
Pélargonidine



Catéchine



Cyanidine



Leucocyanidine

E - Exemple d'un tanin condensé

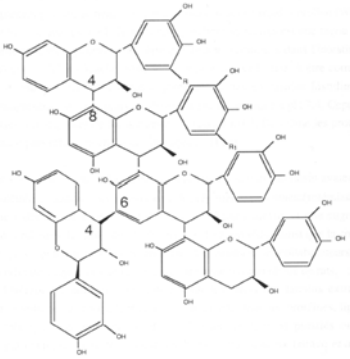


Figure B.I.6 : structure (A) des acides phénoliques, (B) des sinapines, (C) de tanins hydrolysables, (D) des unités de base des tanins condensés et (E) d'un tanin condensé du colza (extrait de Naczk *et al.*, 1998, et de Rozan, 1997).

Les composés phénoliques sont capables de se complexer avec les protéines de colza. Environ 50 % des polyphénols sont complexés aux protéines dont 30 % par liaison ionique, 10 % par liaison hydrophobe, 10 % par liaison hydrogène et 10 % par liaison covalente (Xu et Diosady, 2000). Notons que les acides phénoliques se fixent préférentiellement sur les albumines (Naczk *et al.*, 1998).

Par cette faculté à se lier aux protéines, les polyphénols jouent un rôle défavorable sur la qualité nutritionnelle des protéines et, en particulier, sur leur digestibilité (Naczk *et al.*, 1998). En effet, à partir d'une certaine concentration, les tanins peuvent, par exemple, provoquer une diminution significative de l'hydrolyse pepsique et chymotrypsique des protéines (Neves et Lourenço, 1998 ; Kroll *et al.*, 2000). Les tanins ont aussi été identifiés comme inhibiteurs de l'absorption des protéines et du fer suite à la formation de complexes insolubles protéines-tanins ou fer-tanins dans le tractus gastro-intestinal (Naczk *et al.*, 1998).

Les polyphénols modifient également les propriétés organoleptiques des aliments. Tout d'abord, ils altèrent le goût. En effet, certains composés phénoliques ont des propriétés astringentes et d'autres sont amers (Shahidi et Naczk, 1992). Ils altèrent aussi la couleur de l'aliment. En effet, les produits d'oxydation des polyphénols (quinones) conduisent par complexation avec les protéines à des polymères noirs foncés (Godon, 1996). Enfin, certains polyphénols, dont la sinapine, deviennent odoriférants après avoir été oxydés (Naczk *et al.*, 1998).

Toutefois, certains composés phénoliques du colza (1-*O*-β-D-glucopyranosyle sinapate et tanins) possèdent de bonnes activités antioxydantes (Wanasundara *et al.*, 1994 ; Amarowicz *et al.*, 2000).

I.2.3.3. L'acide phytique.

Le nom chimique de l'acide phytique est l'inositol hexaphosphate. Il représente entre 1 et 7 % (sur la base de la matière sèche) du tourteau de colza (Schwenke, 1994 ; Serraino et Thompson, 1984). Les autres inositol phosphates (inositol tri-, tétra-, penta-phosphates) constituent environ 0,4 % de la farine de colza (Newkirk et Classen, 1998).

Par la présence de ces six groupes phosphate (figure B.I.7), l'acide phytique possède 12 protons dissociables. Aux pH acides, l'acide phytique est fortement chargé négativement, se combinant alors aux cations bi- et trivalents (calcium, magnésium, fer, zinc et molybdène) et aux protéines chargées positivement (albumines et globulines). Les complexes binaires phytates-cations peu solubles sont peu absorbés et peuvent être à l'origine d'une diminution

de la biodisponibilité des minéraux précédents (Erdmann et Forbes, 1981 ; Schwenke, 1994). D'après Lathia *et al.* (1987), les complexes phytates-protéines sont peu digérés par les enzymes digestives. Cependant, des résultats contraires ont été trouvés par Thompson et Serraino (1986).

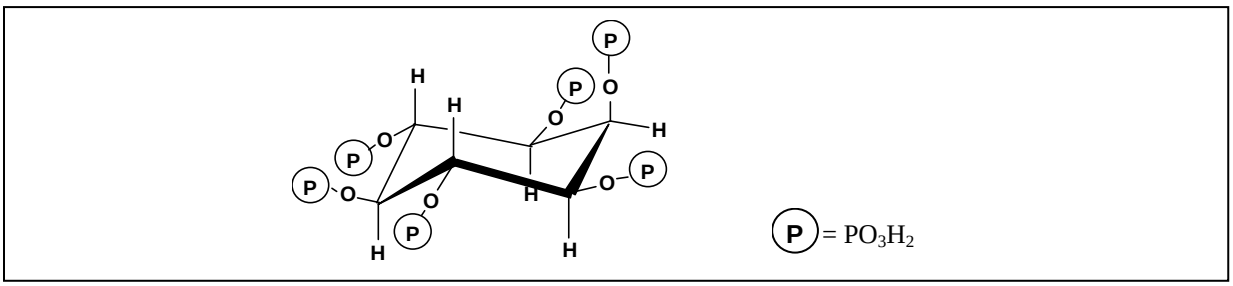


Figure B.I.7 : structure chimique de l'inositol hexaphosphate (acide phytique).

L'acide phytique présenterait également de nombreuses activités biologiques bénéfiques. Il aurait des activités anticholestérolémiante, inhibitrice de l'agrégation plaquettaire et antivirale (inhibition de la réplication du V.I.H.). La plupart des mécanismes d'action n'ont cependant pas encore été élucidés.

I.2.3.4. Les molécules d'origine protéique.

Il existe trois inhibiteurs de protéases à sérine dans le colza : RTI-I et RTI-II (de 19 kDa et thermolabiles) et RTI-III (de 6,7 kDa et thermostables) (Vioque *et al.*, 2001 ; Ceciliani *et al.*, 1994 ; Mar Yust *et al.*, 2004).

Les protéines végétales sont généralement bien tolérées immunologiquement par les humains (Godon, 1996). Cependant de récentes études ont montré que la napine et probablement les oléosines sont responsables de réactions allergiques « alimentaires » de type I (classique) chez certains sujets hypersensibles (Palomares *et al.*, 2002 ; Toriyama *et al.*, 1998).

I.3. CONCENTRATS ET ISOLATS DE PROTEINES DE COLZA.

En dehors de l'utilisation en alimentation animale, certaines voies de valorisation non-alimentaires du tourteau de colza ont été envisagées. Des études ont été menées afin de l'utiliser dans la fabrication de matériaux biodégradables, en tant que combustible ou en tant que milieu fermentescible par des microorganismes producteurs de molécules recombinantes (CETIOM 44, 1998). Toutefois, ces débouchés sont limités et peu concluants.

La présence des composés antinutritionnels empêche l'incorporation du tourteau en tant que telle dans l'alimentation humaine. Ces derniers peuvent être toxiques, sont générateurs de goûts, d'odeurs et de couleurs désagréables et peuvent modifier l'expression des propriétés fonctionnelles ou la texturation des protéines. C'est pourquoi, de nombreux travaux ont été entrepris afin de mettre en œuvre et d'optimiser des procédés d'obtention de concentrats ou d'isolats de protéines à partir de farines de tourteaux de colza ou de graines de colza.
Les concentrats (teneur en protéines d'au moins 60 %) sont obtenus par extraction sélective des composés hydrosolubles non protéiques tandis que les isolats (teneur en protéines supérieure à 90 %) sont obtenus par solubilisation puis récupération sélective des protéines.
Toutefois, lors du développement de ces procédés de détoxification des farines de colza , il s'est avéré que l'élimination des composés antinutritionnels est difficile (Schwenke, 1994).

I.3.1. Préparation de concentrats protéiques.

I.3.1.1. Préparation classique de concentrats protéiques.

Les concentrats sont produits en extrayant le plus complètement et le plus sélectivement possible les composés indésirables par des solvants aqueux plus ou moins polaires. Les protéines ne doivent pas être solubilisées lors de cette opération et le produit final est, du fait de l'élimination de composés solubles non protéiques, enrichi en protéines (60 – 90 %) et en glucides pariétaux (Godon, 1996).

Le choix du solvant est fondamental. Ce choix est dicté par des contraintes nutritionnelles, organoleptiques et technologiques :

- d'un point de vue nutritionnel, le solvant doit être de grade alimentaire (Directive du conseil CEE 88 344, 1988). En outre, il doit solubiliser les composés antinutritionnels de la farine. L'extraction par des solvants affecte généralement peu la valeur nutritionnelle des protéines ;
- d'un point de vue organoleptique, le solvant doit extraire les composés responsables de l'amertume (polyphénols) et de l'astringence (glucosinolates) ;
- d'un point de vue technologique, le solvant doit pouvoir s'éliminer facilement du concentrat. Le solvant doit maintenir ou améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines (Godon, 1996).

Le principe généralement retenu pour la fabrication de concentrats protéiques est schématisé dans la figure B.I.8. La farine est extraite successivement ou à contre-courant avec un solvant dans lequel se solubilisent les molécules d'intérêt, puis ce solvant est récupéré par distillation. En règle générale, le nombre d'extraction est compris entre 3 et 10, et le ratio farine/solvant est de l'ordre de 100 – 200 g/L (Naczk *et al.*, 1992, 1998 ; Kozlowska et Zadernowski, 1983, tiré de Godon, 1996 ; Bérot *et al.*, 1983).

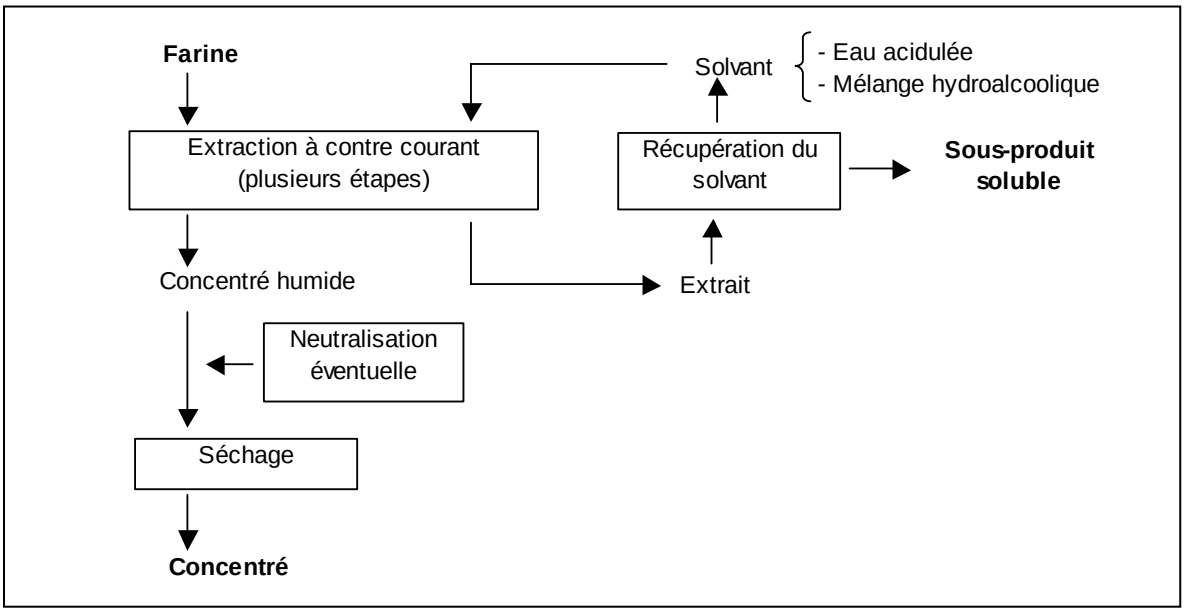


Figure B.I.8 : principe du procédé de fabrication de concentrats protéiques.

Les solvants d'extraction utilisés pour la préparation de concentrat protéique à partir de farine de colza ont été l'éthanol, le méthanol (acidifié), le t-butanol, l'acétone à 70 % (v/v) et des mélanges acétone-méthanol-eau (7:7:6, v/v/v) ou méthanol-ammoniaque (3:2, v/v). Les mélanges éthanol/eau sont les solvants les plus fréquemment utilisés. Les concentrations les plus élevées en éthanol (entre 55 et 70 %) sont les plus aptes à la fabrication de concentrat à partir de farine de colza car il est observé, d'une part, une solubilité maximale des lipides polaires, des polyphénols, de l'azote non protéique et des sucres solubles et, d'autre part, une solubilité minimale des protéines (< à 10 %) (Kozlowska et Zadernowski, 1983, tiré de Godon, 1996 ; Bérot *et al.*, 1983).

Suivant le solvant employé, les extractions permettent une réduction du contenu des acides phénoliques de 60 à 97 % et de celui des glucosinolates de 70 à 90 % (Dabrowski et Sosulski, 1983 tiré de Naczk *et al.*, 1998 ; Fauduet *et al.*, 1995 ; Shahidi *et al.*, 1990 ; Liu *et al.*, 1995). Cependant de tels traitements n'éliminent pas l'acide phytique.

I.3.1.2. Autres procédés de concentration des protéines de la farine.

D'autres procédés originaux mais économiques, comme par exemple la fermentation de la farine, ont été étudiés afin de détoxifier les farines de colza (Vig et Walia, 2001; Rozan *et al.*, 1996).

La détoxification de la farine par voie enzymatique a aussi fait preuve de résultats encourageants. Nous citerons, par exemple, l'emploi de phytases pour l'hydrolyse des acides phytiques (Newkirk et Classen, 1998 ; Mahajan et Dua, 1997), de myrosinases pour l'élimination des glucosinolates (Van Megen Wilhelmus, 1981) et d'une préparation enzymatique d'origine fongique pour l'élimination de la sinapine (Lacki et Duvnjak, 1999).

I.3.2. Préparation d'isolats protéiques.

Les isolats sont issus de la mise en œuvre de deux étapes successives ; la première consiste à solubiliser les protéines et à les séparer des substances insolubles et la seconde consiste à récupérer ces protéines de façon aussi sélective que possible en les séparant des petites molécules restées solubles (composés antinutritionnels, sels, sucres, azote non protéique).

Un schéma des procédés classiques d'obtention d'isolats protéiques à partir des farines de tourteaux de colza est présenté dans la figure B.I.9.

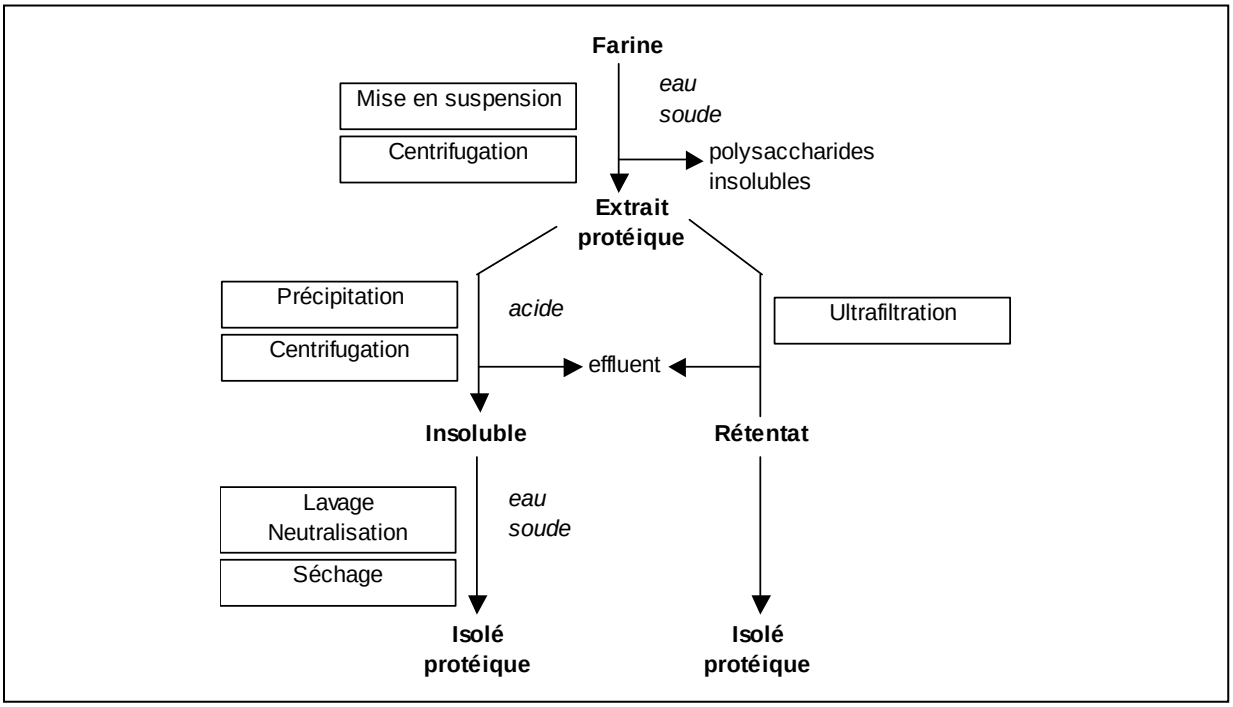


Figure B.I.9 : schéma de fabrication d'isolats protéiques (extrait de Godon, 1996).

Le tableau B.I.4 récapitule les méthodes d'isolement des protéines à partir de farines de tourteaux industriels ainsi que le rendement protéique et la pureté protéique du produit final.

Tableau B.I.4 : procédés d'extraction et d'isolement des protéines de farines de tourteaux industriels de colza. (Rdt : rendement protéique par rapport à la farine initiale; P : pureté protéique ; MS : matière sèche ; UF : ultrafiltration ; DF : diafiltration ; SHMP : hexamétaphosphate de sodium ; n.d. : non déterminé).

Procédé d'extraction des protéines	**Rdt (% MS)**	**Procédé de récupération des protéines solubilisées**	**Rdt (% MS)**	**P (%)**	**Référence**
• pré-extraction avec de l'eau (× 4) et de l'éthanol à 20 % (× 2) • extraction basique : NaOH 0,2 %	50 à 60 %	• précipitation isoélectrique (pH 5) • lavage du précipité à l'eau, éthanol et acétone	n.d.	98,7 %	Gonçalves *et al.* (1997)
• extraction basique : Na_2SO_3 0,25 % (pH 10,5)	n.d.	• précipitation isoélectrique (pH 5) • lavage du précipité à l'eau	n.d.	97,8 %	Vioque *et al.* (1999, 2000)
• pH basique (NaOH, pH = 11) + addition de 1 % de Na_2SO_3	35 %	• précipitation isoélectrique (pH 3,5)	22 %	82 %	Tzeng *et al.* (1990)
• pH basique (NaOH, pH = 11) + addition de 1 % de Na_2SO_3	35 %	• précipitation isoélectrique • récupération des protéines solubles • UF et DF protéines solubles (seuil de coupure 10 kDa)	11 %	86 %	Tzeng *et al.* (1990)
• pH basique (NaOH 1N) + agitation orbitale	95 à 99 %	• acidification par ajout d'acide acétique (pH 3,5)	88 %	n.d.	Klockeman *et al.* (1997)
• extraction NaCl 5%	40 à 50 %	• UF et DF des protéines solubles (seuil de coupure 10 kDa)	<50 %	94 %	Kroll *et al.* (1991)
• pH basique (NaOH 0,2 N, pH 12,5)	75 %	• ajout d'agent précipitant puis précipitation acide (HCl) - SHMP - carboxymethylcellulose - sulfate d'ammonium	 65 % 85 % 94 %	 n.d. n.d. n.d.	Chen et Rohani (1992)
• extraction à l'eau	faible	• ultrafiltration et diafiltration des protéines solubles (seuil de coupure 50 kDa)	faible	80,4 %	Diosady *et al.* (1984)

I.3.2.1. Méthodes de solubilisation des protéines.

Les paramètres qui régissent l'étape de solubilisation des protéines sont liés à la matière première, à la nature du solvant utilisé et aux conditions de mise en œuvre.

Divers solvants aqueux ont été utilisés afin de solubiliser les protéines présentes dans les farines de colza. Nous pouvons citer l'eau en présence ou non d'hexamétaphosphate de sodium (Thompson *et al.*, 1982a ; Liu *et al.*, 1982 ; Tzeng *et al.*, 1988), des tampons carbonate-bicarbonate (El-Nockrasky *et al.*, 1977) et des solutions de chlorure de sodium à 5 % ou de sulfate de cuivre à 1 % (Kroll *et al.*, 1991). Cependant, la plupart de ces solvants solubilisent mal les protéines ou provoquent une « contamination » indésirable en ions (phosphore) ou en métaux (cuivre) dans le produit protéique final.

En fait, les protéines de colza nécessitent un pH très alcalin pour être notablement solubles ; à pH 11 ou supérieur, 80 à 90 % des protéines sont solubilisées si la farine n'a pas été soumise à des traitements thermiques trop intenses (Blaicher *et al.*, 1983 ; Tzeng *et al.*, 1990 ; Klockeman *et al.*, 1997). En effet, d'après les travaux de Tzeng *et al.* (1990) et de Gonçalves

et al. (1997), même à pH très basique, les protéines de tourteaux industriels sont plus difficilement extractibles par rapport aux farines déshuilées à l'hexane à l'échelle laboratoire. Ainsi, la soude (NaOH) ou le sulfite de sodium (Na_2SO_3) sont les solvants alcalins généralement utilisés pour la solubilisation des protéines. Les rendements d'extraction des protéines sont jusqu'à deux fois plus élevés avec la soude qu'avec le sulfite de sodium mais l'utilisation de ce dernier présente l'avantage d'obtenir un isolat de couleur brun clair (Blaicher *et al.*, 1983; Gonçalves *et al.*, 1997). Ceci est dû au propriétés réductrices du sulfite qui empêchent l'oxydation des polyphénols (Vioque *et al.*, 1999).

L'utilisation de solvant alcalin présente cependant quelques inconvénients ; elle entraîne une diminution de la valeur nutritionnelle et de la digestibilité des protéines suite à :

- la formation de lysinoalanine (toxique) surtout lors de l'emploi de soude supérieure à 1 M à des températures élevées (≥ 60 °C) et pour des durées de solubilisation dépassant 1 h (Savoie *et al.*, 1991 ; Klockeman *et al.*, 1997 ; Xu et Diosady, 1994) ;
- l'isomérisation ou la destruction de certains acides aminés (Savoie *et al.*, 1991) ;
- la formation de complexes ternaires phytate-cation-protéine ou binaires phytate-albumine (pH 8 – 10) qui empêche l'élimination de l'acide phytique : c'est pourquoi, Blaicher *et al.* (1983) ont développé un procédé comprenant une pré-extraction de la farine à pH 4 avant l'extraction basique (élimination des complexes binaires phytate-cation) ;

Certains travaux ont étudié l'influence des conditions opératoires sur la solubilisation des protéines. En règle générale :

- le ratio farine/solvant (p/v) pour la solubilisation des protéines est compris entre 25 et 100 g/L. Plus ce ratio est faible, plus le rendement d'extraction est important (El-Nockrashy *et al.*, 1977 ; Gonçalves *et al.*, 1997 ; Tzeng *et al.*, 1988). L'emploi de ratios supérieurs à 100 g/L entraîne une augmentation de la viscosité de l'extrait et donc des difficultés à centrifuger correctement la suspension ;
- une seule étape d'extraction est souvent préférée car la mise en œuvre d'extractions supplémentaires ne permet qu'une récupération relativement faible des protéines restées préalablement insolubles ;
- une durée d'extraction supérieure à 60 minutes n'entraîne aucune augmentation du rendement protéique (Schweizer, 2002 ; Klockeman *et al.*, 1997).

I.3.2.2. Méthodes de récupération des protéines solubilisées.

La récupération, sous forme d'isolat, des protéines de colza préalablement solubilisées peut être effectuée par précipitation isoélectrique, par précipitation suite à l'ajout d'adjuvants ou par ultrafiltration (tableau B.I.4).

** Récupération des protéines extraites par précipitation.*

Au minimum de solubilité des protéines de colza solubilisées (pH 3,5 - 5), seulement 40 % de la matière protéique est récupérée. Ceci est dû à la prédominance des albumines dont le point isoélectrique est plus élevé (pH 6 - 6,5) (Godon, 1996).

Afin d'augmenter les rendements protéiques de précipitation, les procédés suivants ont été réalisés (tableau B.I.4) :

- précipitations dîtes « multi-étapes » des protéines solubilisées, c'est-à-dire précipitation isoélectrique aux différents minima de solubilité des protéines : pH 4 et pH 6 (El-Nockrasky *et al.*, 1977) ;
- ajout d'agents précipitants tels que l'hexamétaphosphate de sodium ou la carboxyméthylcellulose dans l'extrait protéique pour faciliter la précipitation isoélectrique (Gillberg et Töernell, 1976, Thompson *et al.*, 1982a ; Liu *et al.*, 1982) ou ajout de sulfate d'ammonium afin de précipiter directement les protéines (Chen et Rohani, 1992).

Il apparaît, cependant, que l'ensemble de ces méthodes de récupération des protéines ne permette pas une purification complète des protéines puisque les valeurs de pureté protéique des produits n'atteignent que 73 à 83 %. Les rendements finaux sont également faibles mais l'utilisation de l'ultrafiltration pour la récupération des protéines restées solubles après précipitation isoélectrique des protéines extraites permet d'améliorer le rendement (Tzeng *et al.*, 1990 ; Xu et Diosady, 1994).

** Récupération des protéines extraites par ultrafiltration et diafiltration.*

Des procédés membranaires ont été utilisés afin d'isoler les protéines extraites (Diosady *et al.*, 1984 ; Tzeng *et al.*, 1990 ; Kroll *et al.*, 1991). L'ultrafiltration (UF) permet d'éliminer toutes les molécules de faible masse molaire présentes dans l'extrait protéique (azote non protéique, acide phytique, polyphénols ou glucosinolates). Il est cependant nécessaire de travailler à des

concentrations salines élevées (NaCl à 0,7 – 0,9 M) pour diminuer les interactions électrostatiques entre protéines et acides phytiques ou glucosinolates, et ainsi permettre une élimination totale de ces composés (Kroll *et al.*, 1991). Les polyphénols liés aux protéines ne sont toutefois pas éliminés. C'est pourquoi, Xu et Diosady (2002) préconisent l'ajout de NaCl (0,05 M) et de SDS (1 %) dans l'extrait protéique afin de diminuer les diverses liaisons protéines-polyphénols et d'éliminer par UF les polyphénols libres. Ce procédé permet de réduire de 80 % la teneur en acides phénoliques et de 90 % celle des tanins condensés, et conduit à la production d'isolats de couleur claire sans saveur particulière.
Le charbon actif est quelquefois utilisé afin d'éliminer par adsorption les isothiocyanates et les polyphénols sans perte en protéines (Tzeng *et al.*, 1988 ; Kroll *et al.*, 1991).

I.3.3. Séparation entre les globulines et les albumines de colza.

Les méthodes de séparation entre les globulines et les albumines de colza sont diverses. Leur séparation peut être réalisée par une (ou la combinaison) des techniques suivantes :

- par des techniques chromatographiques : exclusion de taille (Dalgalarrondo *et al.*, 1986), ionique (Monsalve *et al.*, 1990 ; Bérot *et al.*, 2004), phase inverse (Bérot *et al.*, 2004),
- par précipitation fractionnée (Simard *et al.*, 1977),
- par dialyse (Folawiyo et Owusu Apenten, 1997 ; Schwenke *et al.*, 1981 ; Mohamad Ramlan *et al.*, 2002).

Notons que la dialyse est la technique la moins efficace. En effet, les albumines ont tendance à co-précipiter avec les globulines à cause de la formation de complexes entre les protéines et l'acide phytique (Schwenke *et al.*, 1989, cité par Godon, 1996).
La plupart des méthodes ont été développées pour une purification des protéines en faible quantité. Les procédures développées pour une séparation à grande échelle sont la précipitation sélective des protéines par le sulfate d'ammonium (Simard *et al.*, 1977) et la combinaison de techniques membranaires et chromatographiques (Bérot *et al.*, 2004).

I.4. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES PROTEINES DE COLZA.

Les protéines végétales intéressent souvent les industriels de l'agroalimentaire pour leur capacité à posséder diverses propriétés fonctionnelles comme des propriétés moussantes, émulsifiantes et gélifiantes. Ces propriétés résultent de leurs caractéristiques moléculaires ou

physico-chimiques (séquence primaire, structure secondaire ou tertiaire, groupements hydrophiles et hydrophobes).

Le tableau B.I.5 synthétise l'ensemble des résultats de la littérature concernant les propriétés fonctionnelles de protéines de colza plus ou moins purifiées et issues soit de farines de *graines* de colza, soit de farines de *tourteaux* de colza.

Tableau B.I.5 : propriétés fonctionnelles des cruciférines, des napines, de concentrats et d'isolats de protéines de colza. (n.c. : non caractérisé). Propriété fonctionnelle : (+++) excellente, (++) bonne, (+) médiocre, (-) mauvaise.

Type de protéines ou MPV	Cruciférine	Napine	Concentrat	Isolat	Isolat
A partir de farine de	graine	graine	graine	graine	tourteau
Référence / Propriété fonctionnelle	Schwenke, 1994 ; Schwenke *et al.*, 1998; Mohamad Ramlan *et al.*, 2002	Schwenke, 1994 ; Schwenke *et al.*, 1998; Krause et Schwenke, 2001	Ohlson et Anjou, 1979 ; Thompson *et al.*, 1982b ;	Blaicher *et al.*, 1983 ; Dev et Mukherjee, 1986	Vioque *et al.*, 2000; Schwenke *et al.*, 1998
Capacité moussante	++	+++	+/++	+/++	-
Stabilité de la mousse	++	+++	+	+	-
Activité émulsifiante	-/+	-/++	+/++	+	-
Stabilité de l'émulsion	-/+	-	-/+	++	-
Solubilité azotée, pH 7	-/+	+++	+	+	n.c.
Propriétés gélifiantes	+	-	-	-	+
Couleur	n.c.	n.c.	marron clair	marron foncé	marron clair
Saveur	n.c.	n.c.	sans saveur	n.c.	sans saveur

Les albumines et les globulines, de par leurs caractéristiques moléculaires différentes, possèdent des propriétés fonctionnelles différentes. Dans l'ensemble, ces dernières sont plutôt médiocres excepté les excellentes propriétés moussantes des napines dont les caractéristiques sont comparables à celles des albumines de blanc d'œuf (Schwenke, 1994), et les bonnes propriétés moussantes et gélifiantes des cruciférines (Léger et Arntfield, 1993 ; Paulson et Tung, 1989 ; Mohamad Ramlan *et al.*, 2002).

Les propriétés fonctionnelles des MPV sont influencées par divers facteurs tels que la proportion entre albumines et globulines, la méthode de préparation de la MPV considérée et la présence ou non de molécules non protéiques (Schwenke, 1990 ; Mahajan et Dua, 1994 ; Dev et Mukherjee, 1986 ; Rubino *et al.*, 1996).

Les concentrats ou isolats protéiques issus de farines de *graines* de colza possèdent des propriétés fonctionnelles assez bonnes sauf pour les propriétés gélifiantes (Thompson *et al.*, 1982b ; Schwenke *et al.*, 1998). Toutefois, les isolats obtenus à partir de farine de *tourteaux* de colza sont dépourvus de toutes propriétés fonctionnelles intéressantes (Vioque *et al.*, 2000). Mohamad Ramlan *et al.* (2002) ont montré que les traitements industriels de l'extraction de l'huile des graines et particulièrement les traitements thermiques provoquent

une dénaturation voire une polymérisation des cruciférines, des napines et des oléosines. La manifestation la plus visible de ce changement est une forte insolubilisation des protéines. D'après Jensen *et al.* (1995), la solubilité protéique varie de 40 à 85 % suivant le traitement thermique subi par la graine ou le tourteau. Toutes les propriétés fonctionnelles des protéines sont alors très fortement altérées (Schwenke, 1994).

Les potentialités d'utilisation de concentrats de protéines de colza en tant qu'ingrédients dans divers aliments (produit carné ou pâtisserie) ont été évaluées par différents travaux (Ohlson et Anjou, 1979 ; Thompson *et al.*, 1982b). Par exemple, l'ajout de concentrat de protéines de colza dans les saucisses améliore la texture de ces dernières (amélioration des propriétés émulsifiantes) mais entraîne une diminution de leur contenu en graisse (mauvaise rétention de l'huile par les protéines de colza). Le remplacement de la farine de blé par un concentrat de protéines de colza pour la fabrication de pain ne donne pas de résultats satisfaisants notamment à cause d'une mauvaise rétention d'air.

Certaines études portent alors sur l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines de colza par divers procédés tels que des traitements physiques, microbiologiques ou chimiques. Mahajan *et al.* (1999, 2002) ont montré que certains procédés « traditionnels » tels que des traitements thermiques (chauffage au micro-onde…), la germination ou la fermentation améliorent certaines propriétés fonctionnelles de la farine de graines de colza.
L'acylation ou la succinylation (addition de radicaux acétyles ou succinyles) améliorent les propriétés fonctionnelles des farines de graines de colza (Dua *et al.*, 1996), des concentrats (CETIOM 36, 1996), des isolats (Paulson et Tung, 1989 ; Schwenke *et al.*, 1998), de la cruciférine (Guegen *et al.*, 1990) et des napines (Schwenke, 1994 ; CETIOM 44, 1998). Toutefois, les modifications chimiques des protéines altèrent leur digestibilité et elles possèdent une mauvaise image auprès des industriels de l'agro-alimentaire qui voient dans ces procédés chimiques, des problèmes de coût et de toxicité du produit final (Panyam et Kilara, 1996).

En conclusion, la valorisation des protéines de colza reste actuellement principalement limitée à une utilisation des tourteaux en alimentation animale. Des efforts de recherche importants sont réalisés depuis les années 80 pour développer leur utilisation en alimentation humaine. Si ces travaux ont permis de démontrer une certaine faisabilité de procédés de préparation de concentrats et d'isolats protéiques, ils ont également mis en évidence les freins techniques et

économiques qui s'opposent à leur développement à l'échelle industrielle (Schwenke, 1994 ; CETIOM 44, 1998). En effet, la préparation d'isolats de protéines de colza implique une technologie spécifique moins compétitive par rapport aux autres protéines végétales tels que le soja, le blé ou le pois.

Par conséquent, sachant que l'atout principal des protéines de colza est leur excellente valeur nutritionnelle, la valorisation des protéines de colza passe forcément par une amélioration de leurs propriétés fonctionnelles ou par la production, à partir de ces dernières, de molécules biologiquement actives et à haute valeur ajoutée. La protéolyse est un procédé classique qui permet d'obtenir de tels mélanges ou de telles molécules grâce à la génération de peptides.

II. PROTEOLYSE ET PEPTIDES.

II.1. GENERALITES.

Depuis une vingtaine d'années, de par leurs multiples fonctions ou activités, les peptides intéressent particulièrement les industriels des secteurs de l'alimentaire, de la cosmétique ou de la pharmacie. En effet, dans l'industrie alimentaire, ils sont utilisés pour leurs propriétés nutritionnelles (Clemente, 2000), sensorielles (Gill *et al.*, 1996) mais également fonctionnelles (Panyam et Kilara, 1996). Jouant un rôle essentiel dans la qualité et la structure des aliments, le terme de « nutrifonctionnalité » est aujourd'hui employé pour caractériser de telles molécules (Godon, 1996). Les secteurs de la cosmétique et de la pharmacie s'intéressent également aux peptides pour leurs activités biologiques ou physiologiques. De nombreuses études ont en effet montré que les peptides, en particulier les petits peptides (< 1000 g/mol), peuvent être biologiquement actifs (peptides antibiotiques, antiviraux, anti-hypertensifs, morphino-mimétiques et autres), ou encore peuvent posséder des activités anti-oxydantes ou être hypoallergéniques (Pihlanto-Leppälä, 2001 ; Gill *et al.*, 1996).
Suivant les applications finales, il existe plusieurs méthodes pour la production d'un peptide ou d'un mélange de peptides. Ces derniers peuvent être :

- soit synthétisés à partir d'acides aminés,
- soit générés par hydrolyse enzymatique ou chimique de protéines alimentaires.

II.1.1. La synthèse de peptides.

Les peptides synthétiques sont largement utilisés dans la recherche fondamentale et dans les secteurs de la pharmacologie afin de cribler des peptides bioactifs à haute valeur ajoutée. Les peptides synthétiques sont encore très peu utilisés dans l'alimentaire. La synthèse de peptides peut être réalisée soit par voie chimique, soit par voie enzymatique, soit par génie génétique. Le choix de la méthode dépend principalement de la longueur du peptide et de la quantité à produire (Gill *et al.*, 1996).
La synthèse chimique est une méthode répandue et bien maîtrisée : la longueur des peptides pouvant aller de 10 à 100 résidus acides aminés et la quantité produite pouvant aller du mg au kg. Cependant, la synthèse chimique présente beaucoup de désavantages. Cette méthode est très coûteuse, entraîne des problèmes de racémisation des acides aminés et nécessite des

produits réactionnels dangereux pour la santé et l'environnement d'où l'impossibilité de valoriser les peptides dans les produits de grade alimentaire.
La technologie de l'ADN recombinant nécessite quant à elle une très longue et très coûteuse phase de recherche et de développement afin de générer un organisme ou un micro-organisme producteur du peptide en question. Les faibles rendements et les problèmes de purification des peptides produits limite l'utilisation de cette méthode ; elle reste encore en développement pour la production de peptides courts.
Enfin, les peptides peuvent être synthétisés par l'action catalytique des protéases en milieu non-aqueux. Bien que cette méthode présente un certain nombre d'avantages par rapport à la méthode chimique classique (assez peu coûteuse, non dangereuse, pas de racémisation des acides aminés), la disponibilité restreinte des protéases, le manque de connaissances sur la spécificité des protéases dans les milieux non-aqueux et la faible productivité restent les principaux obstacles pour une large utilisation de cette méthode (Gill *et al.*, 1996).

II.1.2. La production de peptides par protéolyse.

Pendant longtemps, les produits de la digestion des protéines contenues dans les aliments ont été uniquement considérés comme un apport en acides aminés essentiels, non essentiels et en azote, indispensables à la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques de l'organisme (Frøkjaer, 1994). Mais aujourd'hui, il est désormais bien établi que les protéines issues de sources diverses, aussi bien animales que végétales, contiennent dans leur séquence primaire des enchaînements d'acides aminés qui, une fois libérés, sont capables d'influencer la physiologie de l'organisme. En fait, depuis une dizaine d'années, la recherche concernant les peptides est principalement focalisée sur les propriétés biologiques et nutritionnelles de ces derniers en vue d'applications médicales, pharmacologiques ou alimentaires (nutraceutiques) (Korhonen *et al.*, 1998).

En ce qui concerne l'hydrolyse chimique des protéines alimentaires, cette dernière présente tellement de désavantages qu'elle n'est quasiment pas utilisée dans le cadre d'applications alimentaires ou pharmacologiques. En effet, les modifications chimiques sont drastiques et peu spécifiques, ce qui entraîne la perte de certains acides aminés, la production de molécules toxiques et la production importante d'acides aminés libres (d'où une augmentation souvent non désirée de l'osmolalité de l'hydrolysat).

D'une part, l'hydrolyse acide des protéines conduit à la destruction totale du tryptophane, à la destruction partielle de la méthionine et à la transformation de la glutamine et de l'asparagine en leurs acides correspondants (Jennings et Lewis, 1969). D'autre part, l'hydrolyse alcaline provoque la racémisation des acides aminés et la destruction par β-élimination de certains acides aminés comme la cystéine, la sérine et la thréonine. Il en résulte alors des composés potentiellement toxiques (Linder *et al.*, 1995). Enfin, le plus dommageable concernant les procédés d'hydrolyse chimique provient de la difficulté à reproduire les peptides cibles d'une hydrolyse à l'autre du fait que l'hydrolyse est très peu spécifique (Clemente, 2000). Cependant, Bitri (2004) a montré qu'il est possible de produire des peptides biologiquement actifs par hydrolyse ménagée (pH 3,5, 37°C, 2 h) de caséine bovine.

Réalisée dans des conditions moyennes de pH (6 – 8) et de température (40°C – 60°C), l'hydrolyse enzymatique de protéines ne présente pas les désavantages de l'hydrolyse chimique. Ainsi, la composition en acides aminés des hydrolysats protéiques est similaire à celle de la protéine d'origine : l'hydrolyse enzymatique des protéines n'affecte pas la valeur nutritionnelle de la protéine source (Maldonado *et al.*, 1998).
L'utilisation des enzymes permet un certain contrôle de la réaction d'hydrolyse et de ses produits d'hydrolyse (Clemente, 2000). Les protéases hydrolysent les liaisons peptidiques (figure B.II.1), formant alors un mélange de peptides et d'acides aminés. La composition peptidique des mélanges varie selon la spécificité de la protéase utilisée et les conditions de mise en œuvre de l'hydrolyse.

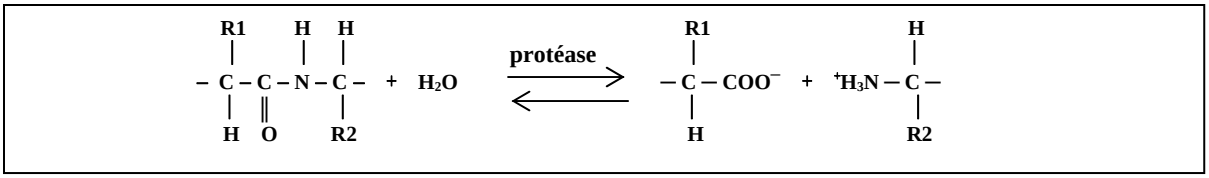


Figure B.II.1 : hydrolyse de la liaison peptidique par une protéase.

Selon les propriétés visées, l'hydrolyse enzymatique des protéines peut être plus ou moins complète. Une hydrolyse poussée conduit à la génération de peptides solubles de petite taille moléculaire (peptides < 15 acides aminés et proportion en acides aminés libres ≥ 20 %). Elle permet l'obtention d'hydrolysats utilisables dans les formulations diététiques, dans les milieux de culture pour microorganismes ou possédant potentiellement des peptides bioactifs. Une hydrolyse limitée permet quant à elle d'obtenir des peptides de plus haute taille moléculaire

(peptides > 15 acides aminés et proportion en acides aminés libres < 10 %) aux propriétés fonctionnelles intéressantes (Blom *et al.*, 1996).

II.2. PROPRIETES NUTRITIONNELLES, SENSORIELLES ET ANTIOXYDANTES DES PEPTIDES.

II.2.1. Propriétés nutritionnelles des peptides et aliments diététiques.

Ayant remplacé les mélanges d'acides aminés libres et les mélanges de protéines, les hydrolysats protéiques sont utilisés dans de nombreuses formulations diététiques aux multiples applications (Clemente, 2000 ; Gill *et al.*, 1996). En effet, ils peuvent constituer un enrichissement en azote protéique dans certains aliments quotidiens (boissons énergisantes, aliments pour personnes âgées), ou dans certaines formulations cliniques destinées aux personnes souffrant de malnutrition, de problèmes de digestion ou d'allergies alimentaires (Frøkjaer, 1994). Ne contenant pas de peptides supérieurs à 12 résidus acides aminés (≈ 1500 Da), ces hydrolysats sont essentiellement composés d'acides aminés, de di- et tripeptides. Ces peptides traversent plus facilement la barrière intestinale et possèdent des propriétés sensorielles plus acceptables, sont plus stables chimiquement et sont plus solubles dans l'eau que les acides aminés libres.

Les hydrolysats protéiques utilisés dans les formulations cliniques sont principalement issus de protéines de lait de vache et de protéines végétales. Parmi les végétaux, le soja et le blé sont les sources protéiques les plus utilisées (Maldonado *et al.*, 1998 ; Adler-Nissen, 1978), mais le pois (Periago *et al.*, 1998), le pois chiche (Clemente *et al.*, 1999), le tournesol (Bautista *et al.*, 1996), les tourteaux de tournesol ou de colza (Bautista *et al.*, 2000 ; Vioque *et al.*, 2000 ; Villanueva *et al.*, 1999) constituent également une alternative aux protéines animales. Le principal inconvénient des hydrolysats de protéines végétales (excepté le colza et le soja) par rapport aux protéines animales est leur faible proportion en acides aminés essentiels. Ces acides aminés doivent être ajoutés aux formulations cliniques afin que ces dernières contiennent la quantité nécessaire (Clemente, 2000).

Certains procédés post-enzymatiques sont nécessaires pour la production d'hydrolysats aux applications cliniques. Deux exemples peuvent illustrer ceci.

- L'un des inconvénients de la protéolyse est la libération de peptides amers qui rendent les propriétés organoleptiques du mélange peptidique inacceptables. Cette amertume des

peptides est due à l'exposition des acides aminés hydrophobes initialement enfouis dans la protéine et à leur interaction avec les récepteurs « de l'amertume » présents dans la bouche (Kunst, 2000). L'amertume des hydrolysats peut être réduite en éliminant les peptides amers à l'aide de méthodes de séparation sélective (précipitation, adsorption sur du charbon actif, techniques chromatographiques ou membranaires), en ajoutant des molécules masquant le goût amer (polyphosphates, cyclodextrine, amidon gélatinisé), ou encore en utilisant des exoprotéases qui permettent la libération des acides aminés hydrophobes (Saha et Hayashi, 2001 ; Aubes-Dufau *et al.*, 1995 ; Pedersen, 1994).

- La production d'hydrolysats hypoallergéniques nécessite également une étape d'ultrafiltration après l'hydrolyse. En effet, le contrôle de la taille moléculaire des peptides par des techniques d'ultrafiltration permet d'éliminer les peptides de haute masse molaire encore présents dans l'hydrolysat et permet ainsi de réduire son contenu en molécules antigéniques (Clemente, 2000 ; Maldonado *et al.*, 1998).

II.2.2. Propriétés sensorielles.

Il est aujourd'hui admis que certains petits oligopeptides jouent un rôle essentiel dans la perception sensorielle des aliments. Certains peptides peuvent être utilisés pour recréer l'une des quatre sensations principales du goût à savoir le sucré, l'amertume, l'aigreur ou le salé (Gill *et al.*, 1996) mais également pour donner le goût umami ou le caractère acide à un aliment. Certains peptides jouent aussi le rôle d'exhausteur de goût (Gly-Leu, Pro-Glu …).

Parmi les peptides sucrés, les dipeptides aspartame (Asp-PheOMe) et alitame (L-Asp-D-AlaNH_2) sont les peptides les plus connus et les plus utilisés dans les produits alimentaires ou pharmacologiques (Gill *et al.*, 1996).

Bien que l'amertume soit en règle générale indésirable, elle reste tout de même une sensation importante pour un certain nombre de produits alimentaires comme la bière, le café, certains jus de fruits et certains fromages. Plusieurs peptides « amers » ont été isolés par des techniques membranaires ou chromatographiques à partir d'hydrolysats protéiques (tableau B.II.1). Il semblerait que l'amertume soit liée à la présence d'acides aminés hydrophobes et basiques dans la séquence peptidique et à la présence de la leucine à son extrémité C-terminale (Lalasidis et Sjöberg, 1978 ; Rao *et al.*, 1998). Leur taille moléculaire est généralement inférieure à 5000 Da (Aubes-Dufau *et al.*, 1995).

Les goûts acide et umami sont généralement associés aux peptides acides alors que les peptides basiques manifestent souvent un goût salé prononcé. Le goût umami est attribué aux peptides contenant des acides glutamiques et aspartiques liés avec des ions sodium (Gill *et al.*, 1996). Quelques exemples de peptides umami identifiés à partir d'hydrolysats sont répertoriés dans le tableau B.II.1.

Tableau B.II.1 : exemples de peptides sensoriels identifiés à partir d'hydrolysats.

Hydrolysat	**Goût**	**Quelques séquences identifiées**	**Référence**
Hydrolysat de protéines de soja	Amer	RL ; RLL ; SKGL	Saha et Hayashi (2001)
		FL ; FIQGV ; LK	Pedersen (1994)
		FLS ; LVGY ; GYPVV ; SNLNFL	Kukman *et al.* (1995)
Hydrolysat pepsique de zéine		AIA ; GAL ; LVL	Saha et Hayashi (2001)
Peptide trypsique de caséine		GPFPVI	Gill *et al.* (1996)
Hydrolysat de protéines de poisson	Umami	EE ; SEE ; ES…	Gill *et al.* (1996)
Hydrolysat de protéines de soja		GES	Gill *et al.* (1996)

II.2.3. Les peptides antioxydants.

Certains hydrolysats protéiques ont la capacité de réduire la vitesse d'auto-oxydation des lipides des aliments. En effet, ils ont la capacité de chélater les métaux lourds et d'accélérer la décomposition des hyperoxydes, molécules possédant des radicaux libres nécessaires aux phénomènes d'oxydation (Gill *et al.*, 1996). Cependant, la relation structure - activité antioxydante des peptides n'a toujours pas été mise en évidence. En isolant six peptides antioxydants (de 5 à 15 acides aminés) d'un hydrolysat de β-conglycinine de soja obtenu avec la protéase S, Chen *et al.* (1995) ont toutefois remarqué que ces peptides possédaient des acides aminés hydrophobes en N-terminal et les acides aminés proline, histidine et tyrosine dans leur séquence.

II.3. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES PEPTIDES.

L'hydrolyse enzymatique des protéines entraîne le plus souvent une perte des propriétés fonctionnelles de ces dernières. Il existe, par exemple, une forte corrélation entre l'augmentation de l'étendue de l'hydrolyse et la diminution des propriétés émulsifiantes (Lahl et Braun, 1994). Dans quelques cas, cependant, il est observé l'inverse, d'une part, au point isoélectrique des protéines, pH où ces dernières possèdent généralement de mauvaises propriétés fonctionnelles et, d'autre part, lorsque les protéines ont subi une forte dénaturation thermique (Panyam et Kilara, 1996 ; Adler-Nissen, 1978).

L'amélioration de certaines propriétés fonctionnelles, associée à une hydrolyse limitée des protéines, est le plus souvent corrélée à une détérioration des autres propriétés fonctionnelles. Le nombre de travaux traitant de l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines par hydrolyse enzymatique est considérable. Quelques exemples se rapportant aux protéines végétales sont récapitulés dans le tableau B.II.2.

Tableau B.II.2 : quelques propriétés fonctionnelles améliorées de protéines d'origine végétale suite à leur hydrolyse enzymatique. (n.d. : non déterminé).

Source protéique	**Protéase**	**DH (%)**	**Propriété fonctionnelle améliorée**	**Référence**
Tourteaux de tournesol	Papaïne	10	Capacité émulsifiante	Cai *et al.* (1996)
Gluten de maïs	Thermitase	5	Capacité moussante/Stabilité émulsifiante	Behnke *et al.* (1989)
Isolat de protéines de soja	Bromélaine	n.d.	Capacité et stabilité moussantes	Molina Ortiz et Wagner (2002)
Isolat de protéines de soja	Alcalase	n.d.	Agrégation thermique	Kim *et al.* (1990)
Isolat de *Brassica carinata*	Alcalase	8,7	Adsorption de l'huile	Pedroche *et al.* (2004)
Farine de blé	Protéase neutre	3,8	Adsorption de l'eau / de l'huile	Bombara *et al.* (1997)
Farine d'avoine	Alcalase	3,8	Solubilité	Ponnampalam *et al.* (1987)
Farine d'avoine	Neutrase	6,0	Solubilité	Ponnampalam *et al.* (1987)
Farine de coton	Bromélaïne	n.d.	Solubilité	Arzú *et al.* (1972)

II.3.1. La solubilité et les propriétés rhéologiques.

La solubilité conditionne l'utilisation des hydrolysats protéiques en tant qu'ingrédients. En effet, une solubilité élevée dans une large gamme de pH, dans différentes conditions ioniques, ou après divers traitements thermiques (comme la pasteurisation ou la stérilisation) est souvent nécessaire pour leur incorporation dans les produits alimentaires (Frøkjaer, 1994). Par exemple, une solubilité élevée des hydrolysats au point isoélectrique permet d'ajouter ces derniers dans les boissons acides afin d'améliorer leur qualité nutritionnelle (Adler-Nissen, 1987).

L'augmentation de la solubilité de protéines suite à leur hydrolyse enzymatique a été très largement étudiée. Ces études montrent que même des hydrolyses partielles ou limitées des protéines résultent en une plus ou moins forte augmentation de leur solubilité, en particulier au pH correspondant à leur point isoélectrique. L'amélioration de la solubilité est due à une augmentation de l'hydrophilie de l'hydrolysat, elle-même due à une plus petite taille des peptides et à l'apparition de nouveaux groupes ionisés (NH_4^+, COO^-) (Mahmoud, 1994). C'est pourquoi, en règle générale, les hydrolysats sont incapables de gélifier. L'inverse a toutefois été observé pour des hydrolyses très limitées de protéines de tournesol ou de lait et dans certaines conditions de pH et de température (Sánchez et Burgos, 1996 ; Doucet *et al.*, 2003).

L'apparition de sites polaires ou hydrophobes après la protéolyse permet, le plus souvent, d'améliorer la capacité des molécules protéiques à fixer l'eau ou l'huile. Les hydrolysats possédant une bonne capacité de rétention d'eau peuvent, par exemple, être utilisés pour prévenir la perte en eau des pâtisseries (Bombara *et al.*, 1997 ; Vioque *et al.*, 2000).

II.3.2. Propriétés émulsifiantes.

De nombreuses études ont été entreprises afin de caractériser les propriétés émulsifiantes d'hydrolysats protéiques. Les sources protéiques, les protéases, les conditions réactionnelles et les méthodes pour analyser ces propriétés sont très diverses. En règle générale, les propriétés émulsifiantes sont déterminées dans des systèmes modèles souvent très éloignés des milieux complexes caractéristiques des systèmes alimentaires (Mahmoud, 1994). Les paramètres les plus communément étudiés pour caractériser les émulsions sont la capacité émulsifiante (gramme d'huile émulsifiée par gramme de protéines), l'activité émulsifiante (aire de l'interface stabilisée par gramme de protéines) et la stabilité de l'émulsion (émulsion persistante après centrifugation ou stockage à une température donnée).
Il est aujourd'hui reconnu que l'hydrolyse limitée améliore généralement les capacités émulsifiantes des protéines au détriment de la stabilité de l'émulsion.

La diminution de la tension interfaciale, essentielle au processus d'émulsification, est dictée par trois phénomènes : la diffusion et l'attachement de la molécule protéique à l'interface, le dépliement de la molécule protéique adsorbée, et le réarrangement des molécules adsorbées à l'interface (Panyam et Kilara, 1996).
L'hydrolyse limitée permet d'exposer les acides aminés hydrophobes initialement enfouis au cœur de la protéine, ce qui améliore, en conséquence l'adsorption des polypeptides à l'interface (Kunst, 2000). Il a d'ailleurs déjà été montré une corrélation positive entre le caractère hydrophobe et les propriétés émulsifiantes (Mahmoud, 1994). La taille moléculaire des peptides influence également les propriétés émulsifiantes ; la longueur de chaîne est estimée autour de 20 acides aminés, ce qui correspond à un degré d'hydrolyse de 3 à 6 % (Kristinsson et Rasco, 2000b, Kunst, 2000). En fait, plus les peptides sont petits, plus ils s'adsorbent rapidement à l'interface mais s'ils sont trop petits, ils sont incapables de se déplier et de se réorienter comme les protéines ou les grands polypeptides, les rendant alors inefficaces pour réduire la tension interfaciale.

II.3.3. Propriétés moussantes.

Les mousses sont des systèmes colloïdaux présentant une phase liquide et une phase gazeuse. La capacité moussante et la stabilité moussante d'une molécule de nature protéique sont influencées par diverses propriétés comme la solubilité (dicte la vitesse de diffusion vers l'interface), la balance hydrophilie/hydrophobie (dicte les interactions interfaciales), la flexibilité (dicte la capacité à se déplier à l'interface) et la présence de groupes chargés ou de groupes polaires (dicte l'hydratation) (Panyam et Kilara, 1996).

Comme pour les propriétés émulsifiantes, l'hydrolyse limitée améliore l'activité moussante des protéines mais provoque, en contre partie, une détérioration de leur stabilité moussante (Chobert *et al.*, 1996). L'activité moussante semble être favorisée par la présence d'acides aminés aromatiques dans la séquence des peptides. D'après Molina Ortiz et Wagner (2002), qui ont étudié les propriétés moussantes d'hydrolysats d'isolat de soja, la solubilité protéique a un impact plus important sur la formation et la stabilisation des mousses que l'hydrophobie de surface. Une étude conduite par Althouse *et al.* (1995) a montré que les grands peptides et les protéines non dégradées d'un hydrolysat de protéines de lait par l'Alcalase ont un effet inhibiteur sur les propriétés moussantes de l'hydrolysat ; les petits peptides, fractionnés par ultrafiltration, possèdent quant à eux d'excellentes capacités et stabilités moussantes.

II.4. ACTIVITES PHYSIOLOGIQUES OU BIOLOGIQUES DES PEPTIDES.

La séquence primaire de la plupart des protéines, qu'elles soient d'origine animale ou végétale, peut comporter la séquence primaire de peptides biologiquement actifs. Cependant, la protéine source est inactive et ce n'est qu'une fois libéré que le peptide devient actif : son activité étant liée à sa composition intrinsèque et à sa séquence en acides aminés (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Les peptides physiologiquement actifs forment un groupe très complexe et très divers de substances qui interviennent dans la modulation de divers processus physiologiques du corps humain (Meisel, 1998). Les peptides opioïdes, antithrombotiques, antimicrobiens et anti-ACE (Angiotensin I - Converting Enzyme) sont les plus étudiés de ce groupe mais les peptides peuvent aussi être des immunomodulants, des transporteurs de minéraux ou des antigénotoxiques. La figure B.II.2 présente un éventail des fonctions des peptides bioactifs.

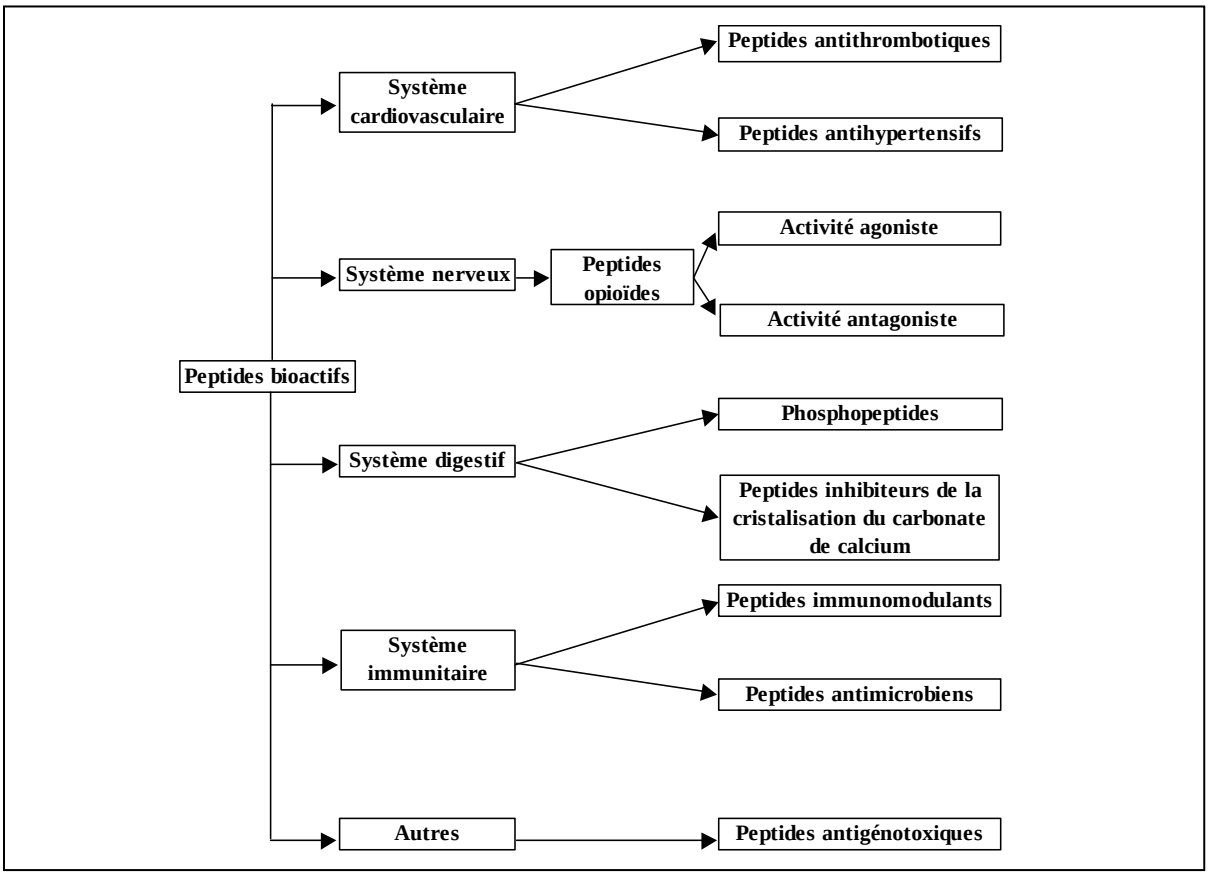


Figure B.II.2 : fonctions des peptides bioactifs (inspiré de Silva et Malcata, 2004).

Les peptides bioactifs peuvent être utilisés en tant que nutraceutiques ou médicaments (Li *et al.*, 2004). Ils contiennent généralement entre 3 et 20 résidus d'acides aminés. Cependant, les relations entre la structure et la fonction des peptides bioactifs restent souvent non élucidées. Ceci est dû au fait que les petits peptides peuvent exister sous de multiples conformations et peuvent adopter diverses structures tridimensionnelles pour se fixer sur les récepteurs ou sur les enzymes (Aalbersberg, 1999). Nous nous limiterons, dans ce paragraphe, à quelques exemples de peptides biologiquement actifs isolés ou identifiés à partir d'hydrolysats protéiques (Tableau B.II.3).

La littérature concernant les peptides bioactifs est très abondante, c'est pourquoi, seuls les peptides opioïdes, anti-ACE et antimicrobiens sont abordés dans ce chapitre.

Tableau B.II.3 : quelques peptides biologiquement actifs issus d'hydrolysats protéiques.

Activité	Précurseur protéique	Protéase utilisée	Séquence	Référence
Opioïde	α-lactalbumine (lait)	Pepsine	YGLF (α-lactorphine)	Pihlanto-Leppälä, 2001
	β-lactoglobuline (lait)	Pepsine + Trypsine	YLLF (β-lactorphine)	Pihlanto-Leppälä, 2001
	γ-caséine	Trypsine	YPVEPFTE	Silva et Malcata, 2004
	β-caséine (lait)	-	YPFPGPIPNSL (β-casomorphine)	Meisel, 1998
	Hémoglobine	Pepsine + Pancréatine	YPWT (hémorphine)	-
	Hémoglobine bovine	Pepsine	Fragments 31-40 de la chaîne β : LVVYPWTQRF (LVV-hémorphines-7)	Zhao *et al.*, 1995 Dagouassat *et al.*, 1996 Kapel *et al.*, 2003
	Blé (gluténine)	Pepsine + Thermolysine	GYYPT (exorphine A5)	Fukudome et Yoshikawa, 1992
	Blé	Pepsine + Thermolysine	GGWL (exorphine B5)	
	Blé	Pepsine + Trypsine + Chymotrypsine	YPISL (exorphine C)	Fukudome et Yoshikawa, 1993
Anti-hypertensive (anti-ACE)	Lait bovin	-	FFVAP	Gill *et al.*, 1996
	β-lactoglobuline (lait)	Trypsine	ALPMHIR ou VFK	Meisel, 1998
	α-lactalbumine (lait)	Trypsine	WLAHK	Pihlanto-Leppälä, 2000
	β-lactoglobuline (lait)	Protéinase K	IPA	Pihlanto-Leppälä, 2001
	β-caséine (lait)	-	AVPYPQR (casokinine)	Meisel, 1998
	Tournesol (globuline)	Pepsine + Pancréatine	FVNPQAGS	Megías *et al.*, 2004
	Soja	Alcalase	DLP et DG	Wu et Ding, 2002
	Soja (conglycinine)	Protéase acide de *Monascus purpureus*	LAIPVNKP et LPHF	Kuba *et al.*, 2004
	Soja (glycinine)		SPYP et WL	Kuba *et al.*, 2004
	Maïs (zéine)	Thermolysine	IRA	Li *et al.*, 2004
Antithrombotique	Lait bovin	-	KNQDK	Gill *et al.*, 1996
	K-caséine (lait)	-	MAIPPKKNQDK (casoplateline)	Meisel, 1998
	Soja (glycinine)	Pronase	-	Gibbs *et al.*, 2004
Antimicrobienne	Lactoferrine	Pepsine	Fragment 17-41 (lactoferricine)	Meisel, 1998
	Lysozyme (blanc d'œuf)	Pepsine + Trypsine	IVSDGDGMNAW	Mine *et al.*, 2004
	Caséine	Trypsine	Hydrolysat	Biziulevičius *et al.*, 2002
	Hémoglobine bovine	Pepsine	Fragment 1-23 de la chaîne alpha	Froidevaux *et al.*, 2001
Immunoactive	β-caséine (lait)	Pepsine + Chymosine	YQEPVLGPVRGPFPIIV	Meisel, 1998
	α_{s1}-caséine	Chimosine	RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF	Silva et Malcata, 2004
Amélioration de la biodisponibilité des minéraux	Caséine	Alcalase ou Trypsine	Sequence-ΣΣΣEE Σ = Ser(P)	Adamson et Reynolds, 1996
	Soja	Protéase M	-	Jin *et al.*, 2000
Antigénotoxique	Plasma sanguin (bovin)	Alcalase ou Trypsine	Peptides < 1000 Da	Park et Hyun, 2002
Digestive	Crustacés/Poissons	Alcalase	Peptides < 1000 Da	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, 2003

II.4.1. Les peptides opioïdes.

Parmi les peptides neuroactifs, les peptides aux activités opioïdes sont les plus couramment retrouvés. Les peptides opioïdes modifient le comportement émotionnel et l'appétit grâce à leur faculté à se fixer spécifiquement aux récepteurs cibles liés à ces comportements physiologiques (récepteurs μ, σ et κ). Leur rôle morphino-mimétique est dû à la présence, en N-terminal de leur séquence, des motifs Tyr-Gly-Gly-Phe (typique), Tyr-X-Phe ou Tyr-X_1-X_2-Phe (atypiques) mais d'autres séquences ont été identifiées sur les exorphines issues d'hydrolysats de blé (Pihlanto-Leppälä, 2001 ; Fukudome et Yoshikawa, 1992, 1993).

II.4.2. Les peptides anti-ACE.

Un groupe très important de peptides est celui des inhibiteurs de l'enzyme convertissant, d'une part, l'angiotensine I en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur et, d'autre part, dégradant la bradykinine, un vasodilatateur. Cette enzyme est nommée l'ACE (Angiotensin I – Converting Enzyme). Ainsi, l'ACE permet d'augmenter la pression sanguine. En inhibant l'activité de l'ACE, les peptides anti-ACE sont considérés comme des molécules intéressantes pour traiter l'hypertension mais aussi toutes les maladies cardiovasculaires qui y sont liées (Li *et al.*, 2004). De nombreux travaux ont montré que le nombre d'acides aminés de ces peptides est généralement compris entre 2 et 12 mais que leurs propriétés moléculaires sont différentes selon la nature de la protéine d'origine (Li *et al.*, 2004).

II.4.3. Les peptides antimicrobiens.

A ce jour, plusieurs centaines de peptides antimicrobiens différents ont été isolés. Bien qu'ils diffèrent par leur taille et leur séquence, ces peptides possèdent deux caractéristiques communes ; ils sont polycationiques et leur structure active est amphiphile. Ces peptides sont divisés en deux classes : les peptides cycliques et les peptides linéaires (Tossi *et al.*, 1997).
Ces peptides agissent soit en créant des perturbations au niveau des échanges membranaires du microorganisme suite à la formation de ponts ioniques et à la perméabilisation de la membrane, soit en atteignant une cible spécifique intracellulaire qui active l'autolyse de la bactérie (Epand et Vogel, 1999 ; Biziulevičius *et al.*, 2002).

II.4.4. Multifonctionnalité d'un peptide.

Certains peptides possèdent plusieurs propriétés fonctionnelles ou activités biologiques. La séquence primaire de ces peptides comprend plusieurs séquences caractéristiques de peptides ayant des effets biologiques différents. Par exemple, certains peptides issus de l'hydrolyse de protéines de lait, comme la β-casomorphine, possèdent à la fois une activité opioïde, une activité anti-ACE et une activité immunomodulante (Meisel, 1998). La figure B.II.3 montre quelques régions de la structure primaire d'un peptide multifonctionnel issu de l'hydrolyse de la β-caséine. Ces régions, considérées comme « zones stratégiques », sont partiellement protégées de l'action protéolytique des enzymes (Meisel, 1998).

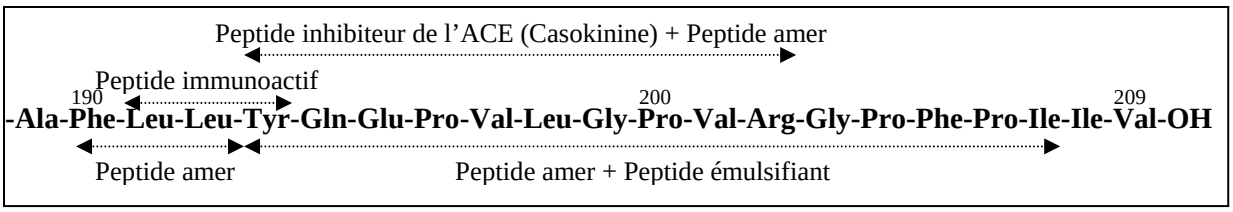


Figure B.II.3 : multi-fonctions d'un peptide issu de l'hydrolyse de β-caséine bovine (extrait de Meisel, 1998).

II.5. PEPTIDES ET MILIEUX DE CULTURE POUR CELLULES PRO- ET EUCARYOTES.

Les hydrolysats de protéines sont principalement utilisés comme ingrédients alimentaires ou médicaments mais, grâce à leur haute solubilité, leurs champs d'application s'ouvrent également dans les domaines de la biotechnologie en tant que peptones. En effet, les hydrolysats peuvent constituer une source azotée aux multiples avantages dans les milieux de culture pour microorganismes, cellules animales ou cellules d'insectes.

II.5.1. Activités des peptides dans les milieux de fermentation.

Les sources nutritives des milieux de culture pour les microorganismes représentent le principal coût dans certains procédés de fermentation. De nombreuses études ont montré qu'il etait possible de remplacer certaines de ces sources nutritives par des hydrolysats protéiques sans altérer la croissance microbienne. Les sources protéiques les plus utilisées sont d'origine marine (Martone *et al.*, 2005 ; Dufossé *et al.*, 2001 ; Guérard *et al.*, 2001) ou végétale (Hsieh *et al.*, 1999 ; Parrado *et al.*, 1993). Dans ces derniers cas, les hydrolysats de protéines de soja ou de tournesol améliorent même la production, par les microorganismes, de la molécule d'intérêt.

II.5.2. Activités des peptides dans les milieux de culture de cellules eucaryotes.

Les cellules de mammifères sont utilisées pour la production d'anticorps monoclonaux, d'hormones, de protéines recombinantes, de virus ou même de tissus humains (Amiot *et al.*, 2005 ; Kunst, 2000). Traditionnellement, les cellules de mammifères sont cultivées dans des milieux contenant des acides aminés libres, du glucose, des minéraux et du sérum de veau fœtal (de l'ordre de 5 à 10 %). Ce dernier est obtenu par défibrination du plasma issu de fœtus

de vache. C'est un mélange extrêmement complexe constitué de molécules aux activités physiologiques différentes, en particulier de molécules activatrices et inhibitrices de la croissance cellulaire. Cependant, l'utilisation du sérum de veau fœtal présente quelques désavantages. Tout d'abord, la composition du sérum varie fortement d'un lot à l'autre. Mais le désavantage majeur lors de son emploi est le risque d'introduire dans le milieu des contaminants infectieux (mycoplasmes), des virus (VIH ou Hépatite B) ou des prions (ESB) (Kunst, 2000). Afin de réduire le risque d'introduire de tels contaminants dans le milieu et d'augmenter la sécurité biologique des préparations médicales, il est apparu évident de remplacer une partie voire la totalité du sérum par des produits d'origine non-animale.

Les tentatives de substitution ou de réduction du sérum dans les milieux de culture de cellules de mammifères ont débuté depuis les années soixante ; le principal intérêt d'alors était plutôt économique car le sérum coûtait cher (Schlaeger, 1996). Les premiers hydrolysats employés pour de telles applications étaient d'origine animale (viande, lait) ou issus de microorganismes (Schlaeger, 1996 ; Amiot *et al.*, 2005).
Des études récentes ont montré que certains hydrolysats protéiques d'origine végétale peuvent remplacer, au moins partiellement, le sérum dans divers milieux de culture de cellules animales ou d'insectes. En effet, des hydrolysats de soja et de blé stimulent, d'une part, la croissance des cellules de mammifères comme les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO), d'ovaires de bébé hamster (BHK), de reins de singe vert (Vero) ou d'hybridomes, et stimulent, d'autre part, la production cellulaire des molécules d'intérêt (Kunst, 2000 ; Blom *et al.*, 1996 ; Franěk *et al.*, 2000). Cependant, il s'avère que les cellules cultivées dans ces milieux sont plus sensibles et plus stressées par rapport aux cellules cultivées dans des milieux classiques, et en conséquence, elles rentrent en apoptose plus rapidement. A partir d'hydrolysats de gluten de blé ou de viande, Franěk (2004) et Schlaeger (1996) ont isolé des fractions peptidiques ayant des propriétés d'agents anti-apoptotiques, favorisant la survie des cellules.

Aujourd'hui, les raisons pour lesquelles les hydrolysats de protéines végétales améliorent, en absence de sérum, la croissance et/ou la production de molécules recombinantes ne sont toujours pas élucidées. Il apparaît seulement que les peptides de tels hydrolysats sont de petite taille moléculaire (< 2500 Da) et assimilables par les cellules. Cependant ces derniers n'ont pas encore été identifiés (Schlaeger, 1996). Plusieurs mécanismes d'action ou rôles potentiels des peptides ont été proposés.

- Il est admis que les peptides, surtout les petits, participent à la valeur nutritionnelle du milieu. Blom *et al.* (1996) ont, dans ce sens, produit un hydrolysat contenant des peptides riches en résidu glutamine, acide aminé indispensable pour la croissance des cellules mais qui n'est pas stable sous forme libre.
- Pour Franěk (2000, 2004), les peptides agissent en tant que facteurs de croissance et/ou de survie et non en tant que simple source en acides aminés (ou azote protéique). Ces peptides mimant des facteurs de croissance faciliteraient l'assimilation des nutriments du milieu suite à une modification des signaux intracellulaires et permettraient l'accélération de la synthèse de l'ADN et donc de la division cellulaire. Inversement, certains peptides auraient la faculté d'arrêter la croissance cellulaire (Franěk *et al.*, 2003). Cet arrêt de la croissance cellulaire serait associé à une augmentation de la production de la molécule d'intérêt par les cellules.
- Pour Kunst (2000), les peptides pourraient agir comme des détoxifiants en fixant les toxines (métaux lourds et endotoxines) ou seraient impliqués dans le transport de composants essentiels (lipides ou vitamines).
- Pour Amiot *et al.* (2005), lorsque les cellules sont adhérentes et cultivées en boîte, les peptides seraient également des facteurs facilitant l'attachement cellulaire. En effet, certains peptides (RGD, YIGSR) sont connus pour faciliter l'attachement des cellules à la surface des boîtes de culture, permettant ainsi une meilleure « colonisation » du milieu et en conséquence une meilleure croissance des cellules (Amiot *et al.*, 2005).

II.6. HYDROLYSATS DE PROTEINES DE COLZA.

Moins d'une quinzaine de travaux portent sur l'hydrolyse des protéines de colza et la valorisation de peptides de colza. Le tableau B.II.4 recense l'ensemble de ces travaux.

Tableau B.II.4 : travaux portant sur l'hydrolyse de protéines de colza et sur la valorisation des peptides obtenus.

Substrat (source)	**Protéase**	**Caractéristiques de l'hydrolysat**	**Application potentielle ou activité biologique des peptides**	**Référence**
Isolat protéique (tourteau industriel)	Alcalase puis Flavourzyme	▪ DH = 60 % ▪ Composés de petits peptides et d'acides aminés ▪ Composition équilibrée en acides aminés	▪ Non amer ▪ soluble entre pH 2,5 et 7 ▪ Hydrolysat utilisable dans les boissons acides ▪ Fractions peptidiques utilisables dans la supplémentation de formulations alimentaires cliniques	Vioque *et al.* (1999) ; Pedroche *et al.* (2004)
Isolat protéique (tourteau industriel)	Alcalase	▪ DH compris entre 3,1 et 7,7 % ▪ Essentiellement composés de protéines et de longs polypeptides ▪ Composition équilibrée en acides aminés	▪ Amer ▪ Amélioration de l'adsorption de l'eau et de l'huile ▪ Amélioration de l'activité moussante mais diminution de la stabilité moussante ▪ Amélioration de l'activité et stabilité émulsifiantes	Vioque *et al.* (2000)
Isolat protéique (farine délipidée)	Alcalase	▪ DH ≈ 22 %	▪ Hydrolysats inhibent la pepsine ▪ Hydrolysats et fractions de peptides inhibent la protéase du virus VIH	Mar Yust *et al.* (2004)
Concentrat protéique (farine délipidée)	Subtilisine Carlsberg de *Bacillus licheniformis*	▪ Peptides (origine) : - IY (napine) - RIY (napine) - VW (cruciférine) - VWIS (autre protéine)	▪ Peptides anti-ACE	Marczak *et al.* (2003)
Farine delipidée	Pepsine Papaïne Trypsine Ficine	▪ Diminution des composés antinutrionnels	▪ Amélioration des propriétés : - solubilité - propriétés moussantes - adsorption eau et huile ▪ Diminution des propriétés émulsifiantes	Mahajan et Dua (1998)
Concentrat protéique (tourteau industriel)	Orientase	▪ DH = 32 % ▪ Distribution de taille des peptides : - < à 1 kDa = 74 % - entre 1 et 10 kDa = 23 % - > à 10 kDa = 3 %	▪ Promeut la croissance de cellules d'insecte Sf9 dans des milieux sans sérum ▪ N'affecte pas le métabolisme cellulaire	Deparis *et al.* (2003)
Farine décortiquée et délipidée	Hydrolyse mono-, di- ou trienzymatique : - pepsine - trypsine - papaïne	▪ Azote soluble en fin de réaction dans 20 % de TCA varie de 34 à 55 % ▪ Libération de peptides de faibles masses molaires	▪ Le système pepsine (60 mn) et trypsine (120 mn) est celui qui libère le plus de petits peptides ▪ Ultrafiltration (10 kDa) → amélioration des propriétés nutritionnelles	Lacroix *et al.* (1983a, 1983b et 1988)
Farine de tourteaux industriels	13 protéases commerciales	▪ DH varie de 4,6 à 53 %	▪ Amélioration de la valeur nutritive → amélioration de la croissance des poulets	Simbaya *et al.* (1996)
Concentrat protéique (tourteau industriel)	Alcalase	▪ DH = 28 % ▪ fractionnement par des procédés membranaires → hydrolysat composé de peptides < 1 kDa	▪ Propriétés antioxydantes ▪ Amélioration de la valeur nutritive ▪ Favorise ou inhibe la croissance de microorganismes d'intérêt industriel	Tessier (2004)
Extrait protéique (tourteau industriel)	Proleather FG-F	▪ DH = 7 ou 14 %	▪ Remplacement de 20 à 50 % des protéines de blanc d'œuf dans la confection de mayonnaise	Aluko et McIntosh (2005)

III. PROCEDES DE PROTEOLYSE ENZYMATIQUE, MODELISATION ET CARACTERISATION DES PEPTIDES.

III.1. PROCEDES DE PROTEOLYSE ENZYMATIQUE.

Le matériel (enzymes, protéines, réacteurs), les méthodes pour suivre l'étendue de l'hydrolyse, les conditions opératoires de l'hydrolyse sont des aspects clefs des procédés d'hydrolyse (Lahl et Braun, 1994). En effet, la « nutrifonctionnalité » et l'activité biologique des peptides sont d'abord influencées, d'une part, par la spécificité de l'enzyme et, d'autre part, par la nature physique et chimique des protéines (Mahmoud, 1994). De plus, pour un système enzyme/substrat donné, les conditions d'hydrolyse tels la durée, le pH, la température et le ratio enzyme/substrat sont les principaux paramètres influençant les propriétés moléculaires des peptides générés. La figure B.III.1 présente l'ensemble des paramètres influençant l'hydrolyse et, par conséquent, la nature et la taille des peptides.

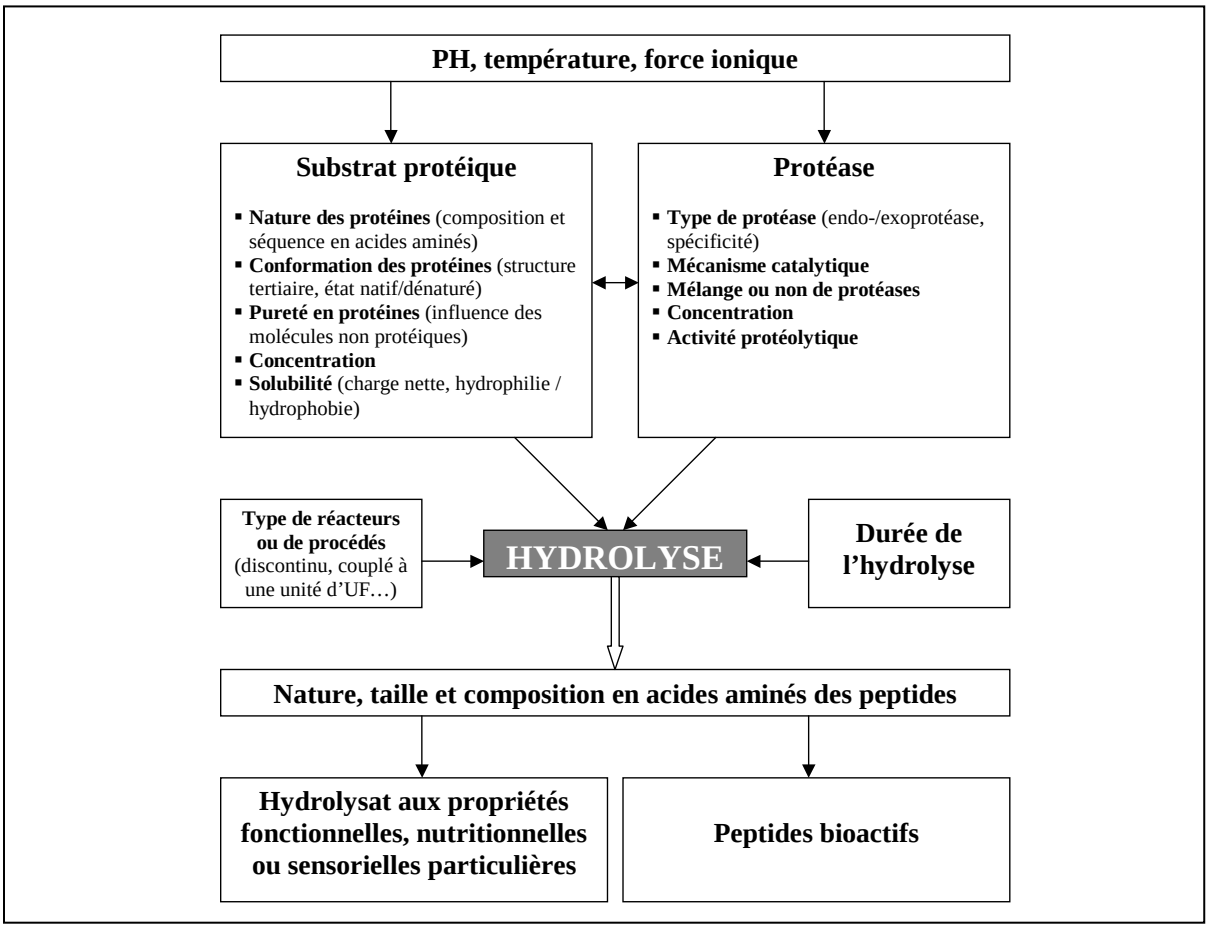


Figure B.III.1 : paramètres influençant l'hydrolyse et la qualité des produits terminaux.

III.1.1. Les protéases et les sources protéiques.

Malgré les nombreux travaux portant sur la protéolyse, il est difficile de les comparer car, d'une part, les protéines utilisées varient selon leur origine ou de leur mode de préparation et, d'autre part, les enzymes ont rarement une spécificité et une pureté semblables. L'autre obstacle est l'absence de standardisation des protocoles employés (rapport enzyme/substrat, détermination des activités enzymatiques…) (Driou *et al.*, 1985).

III.1.1.1. Les différents types de protéases.

Les protéases sont des catalyseurs biologiques présentant, d'un côté, une spécificité réactionnelle liée à la conformation et à la composition en acides aminés de leurs sites catalytiques et présentant, d'un autre côté, une spécificité au niveau du substrat liée à la complémentarité tridimensionnelle entre l'enzyme et le substrat (Godon, 1996). Le commerce fournit aujourd'hui un très large choix de protéases aux spécificités diverses et aux valeurs optimales de pH et de température différentes (Panyam et Kilara, 1996). Leurs origines sont aussi très diverses puisqu'elles peuvent être d'origine végétale (papaïne, bromélaïne, kératinase…), animale (trypsine, chymotrypsine, pepsine, rénine…), bactérienne (Protamex, Alcalase, Neutrase…), fongique (Corolase, Flavourzyme…) ou virale.
La capacité des protéases à hydrolyser un substrat protéique est très variable ; la spécificité de l'enzyme dicte le nombre et la localisation des liaisonss peptidiques clivables (Panyam et Kilara, 1996). Les protéases peu ou non spécifiques clivent plusieurs liaisons peptidiques tandis que les protéases à spécificité étroite ne clivent qu'après ou avant des acides aminés précis. La spécificité de quelques protéases est schématisée dans le tableau B.III.1.

Tableau B.III.1 : spécificité de quelques protéases (Rao *et al.*, 1998).

Enzyme	**Pont peptidique clivé**
Trypsine	-Lys (ou Arg) ⊥----
Chymotrypsine, subtilisine	-Trp (ou Tyr, Phe, Leu) ⊥----
Protéase V8 de *Staphylococcus*	-Asp (ou Glu) ⊥----
Papaïne	-Phe (ou Val, Leu)-Xaa ⊥----
Thermolysine	---⊥ Leu (ou Phe) ----
Pepsine	-Phe (ou Tyr, Leu) ⊥ Trp (ou Phe, Tyr)-

⊥ : site d'action de la protéase ; Xaa : n'importe quel acide aminé.

Les enzymes protéolytiques sont classées en tant qu'endoprotéases ou qu'exoprotéases. Les endoprotéases hydrolysent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur de la protéine d'où la

production de peptides plus ou moins longs tandis que les exoprotéases clivent les liaisons peptidiques situées aux extrémités N- ou C-terminales entraînant la libération d'acides aminés, de dipeptides ou de tripeptides (Clemente, 2000). Les endoprotéases sont sous-classées en quatre groupes suivant leur mécanisme catalytique : les sérine protéases, les aspartyl protéases, les cystéine protéases et les métalloprotéases (Rao *et al.*, 1998). Le tableau B.III.2 présente les différents groupes de protéases, leurs modes d'action et leurs numéros E.C..

Tableau B.III.2 : classification des protéases (Rao *et al.*, 1998).

Protéase	**Mode d'action**	**Numéro E.C.**
Exopeptidase		
Aminopeptidase	●⊥○–○–○–○---	3.4.11
Dipeptidyl peptidase	●–●⊥○–○–○---	3.4.14
Tripeptidyl peptidase	●–●–●⊥○–○---	3.4.14
Carboxypeptidase	---○–○–○–○–○⊥●	3.4.16-3.4.18
De type sérine		3.4.16
Métalloprotéase		3.4.17
De type cystéine		3.4.18
Peptidyl dipeptidase	---○–○–○–○⊥●–●	3.4.15
Dipeptidase	●⊥●	3.4.13
Endoprotéase	---○–○–○⊥○–○–○---	3.4.21-3.4.24
Serine protéase		3.4.21
Cystéine protéase		3.4.22
Aspartyl protéase		3.4.23
Métalloprotéase		3.4.24

○ : acides aminés ; ● : acides aminés terminaux ; ⊥ : site d'action des enzymes.

Les sérines protéases sont caractérisées par la présence d'une sérine dans leur site actif. Suivant leur structure primaire, elles sont divisées en six sous-groupes dont les chymotrypsines et les subtilisines. Ces dernières sont caractérisées par trois acides aminés constituant une triade catalytique dans leur site actif : une sérine, un acide aspartique et une histidine (Rao *et al.*, 1998). Ces protéases sont généralement actives à pH neutre ou alcalin. Elles sont peu spécifiques.

Les aspartyl protéases, aussi appelées protéases acides, sont caractérisées par la présence d'un acide aspartique dans leur site actif nécessaire à leur activité protéolytique. La pepsine fait partie de ce groupe d'enzymes. Beaucoup de protéases acides ont une activité maximale à pH 3-4. Elles sont spécifiques des acides aminés aromatiques et elles ont une préférence pour les acides aminés hydrophobes (Ala, Val, Leu, Ile, Phe) (Rao *et al.*, 1998).

Les cystéines protéases de plantes sont caractérisées par une diade catalytique composée d'une cystéine et d'une histidine. La papaïne (de la papaye), la ficine (de la figue), la bromélaïne (de l'ananas) et l'actinidine (du kiwi) sont les cystéine protéases les plus connues.

Le pH optimal de ces enzymes est situé autour de 7. Ces protéases sont assez spécifiques. La papaïne est spécifique du tryptophane et des acides aminés hydrophobes.
Enfin, les métalloprotéases (Thermolysine, Neutrase) sont caractérisées par leur besoin d'un ion métallique divalent pour être actives (Rao *et al.*, 1998).

La production de peptides aux caractéristiques physicochimiques définies nécessite une sélection stratégique des enzymes (Lahl et Braun, 1994 ; Arzú *et al.*, 1972 ; Kristinsson et Rasco, 2000b). En effet, la taille et le caractère hydrophobe des peptides produits sont fonction de la nature et de la spécificité de l'enzyme (Smyth et FitzGerald, 1998 ; Mahmoud, 1994). Par exemple, la trypsine est généralement choisie pour la production de peptides émulsifiants car cette dernière clive spécifiquement en C-terminal de la lysine et de l'arginine, favorisant alors la génération de peptides présentant les zones hydrophobes nécessaires à l'émulsion (Mahmoud, 1994) ; l'Alcalase, qui a une large spécificité avec une préférence notamment pour les acides aminés hydrophobes, génère des hydrolysats moins amers que la plupart des autres endoprotéases (Doucet *et al.*, 2003 ; Lahl et Braun, 1994).
Le choix des enzymes résulte souvent d'un compromis entre des critères d'efficacité et des critères économiques. En effet, une augmentation de la concentration en enzyme résulte le plus souvent en une augmentation de la vitesse d'hydrolyse mais entraîne en conséquence une augmentation du coût du procédé (Lahl et Braun, 1994).

Chaque préparation enzymatique est plus ou moins pure. Bjurlin *et al.* (2002) ont montré que l'activité enzymatique varie d'une protéase à l'autre de plusieurs ordres de grandeur. Ils ont aussi mis en évidence que les préparations enzymatiques sont très souvent composées de plusieurs fractions actives (de 1 à 4). C'est pourquoi, il est souvent nécessaire de quantifier l'activité protéolytique des enzymes.

III.1.1.2. Mesure de l'activité enzymatique.

Une méthode simple et rapide pour comparer l'activité protéolytique de différentes protéases est la méthode de la « chute de pH » ou « pH-drop » (Deeslie et Cheryan, 1981). L'hydrolyse non contrôlée des protéines se caractérise par une diminution du pH suite à une production de protons. Ainsi, plus l'activité protéolytique d'une enzyme sur un substrat donné est importante, plus le pH diminue rapidement. Toutefois, cette méthode ne fournit qu'un aperçu global de l'activité des préparations.

Il existe deux types de méthodes pour quantifier l'activité protéolytique : celles dosant l'azote soluble après digestion de protéines de référence (hémoglobine dénaturée ou caséine dénaturée) dans des conditions précises de pH et de température (Bjurlin *et al.*, 2002) et celles dosant des chromophores libérés suite à l'hydrolyse de substrats synthétiques tels que le NαBenzoyl-L-Arginine Ethyl-Ester (BAEE), le p-Toluènesulfonyl-L-Arginine Méthyl-Ester (TAME), les substrats couplés à l'Amino-Méthyl-Coumarine (AMC)… (Mullally *et al.*, 1994 ; Smyth et FitzGerald, 1998). Les substrats synthétiques sont utilisés pour caractériser une activité endo- ou exoprotéasique bien spécifique tandis que les méthodes utilisant des substrats naturels permettent de mesurer l'activité globale des enzymes (Smyth et FitzGerald, 1998 ; Mullally *et al.*, 1994). Ces dernières sont souvent préférées du fait que la plupart des préparations enzymatiques commerciales sont caractérisées par de telles méthodes.

III.1.1.3. Les différentes sources protéiques.

Les protéines les plus souvent hydrolysées sont les protéines de lait (Pihlanto-Leppälä, 2001 ; Bordenave *et al.*, 2000), les protéines de poissons (Bordenave *et al.*, 2002 ; Guerard *et al.*, 2002 ; Kristinsson et Rasco, 2000a) et les protéines de soja (Adler-Nissen, 1978 ; Lahl et Braun, 1994). De nombreuses MPV ont également été utilisées comme substrat protéique. Il est souvent recommandé d'utiliser des MPV caractérisées par une forte teneur en protéines et de faibles teneurs en composés antinutritionnels afin d'augmenter l'efficacité d'hydrolyse des protéases (Clemente, 2000). En effet, les tanins, les acides phénoliques et les fibres modifient l'efficacité catalytique de nombreuses enzymes comme, par exemple, la trypsine et le lysozyme (Rohn *et al.*, 2002 ; García-Carreño, 1996 ; Gonçalves *et al.*, 1997 ; Nacer *et al.*, 2004). Ainsi, en règle générale, les protéines végétales utilisées pour la génération d'hydrolysats proviennent de matières premières qui ont préalablement été purifiées en protéines et détoxifiées de leurs composés non-protéiques.

Avant l'étape d'hydrolyse, les substrats protéiques sont souvent traités thermiquement (10 – 30 mn à 90 °C – 100 °C). Ceci permet de dénaturer les protéines et ainsi d'augmenter la vitesse et l'étendue de l'hydrolyse grâce à une meilleure accessibilité des liaisons peptidiques par l'enzyme (Deeslie et Cheryan, 1981 ; Van der Plancken *et al.*, 2003).

La variabilité de la matière première peut poser des problèmes de reproductibilité de la composition en peptides des hydrolysats et donc des problèmes de reproductibilité des propriétés recherchées pour l'hydrolysat (Dufossé *et al.*, 2001).

De même, les caractéristiques intrinsèques d'un isolat donné influencent la réaction d'hydrolyse. En effet, Henn et Netto (1998) ont montré, suite à l'hydrolyse de treize isolats commerciaux de protéines de soja se différenciant par l'état de dénaturation des protéines, par leur pureté et par leur proportion globuline/albumine, des différences dans la réaction d'hydrolyse, dans la taille et les propriétés fonctionnelles des peptides obtenus. Ainsi, un substrat protéique de composition stable et reproductible est primordial pour l'obtention de peptides ciblés.

III.1.2. Les paramètres de l'hydrolyse.

Pour un système enzyme/substrat donné, les conditions réactionnelles de l'hydrolyse affectent considérablement les caractéristiques moléculaires des peptides (Godon, 1996). Les paramètres d'hydrolyse les plus importants sont la température, les concentrations initiales en enzyme et en substrat, la durée, le pH et l'étendue de l'hydrolyse (Lahl et Braun, 1994).

III.1.2.1. Le pH.

Le pH modifie, d'une part, l'état d'ionisation des groupements du site actif de l'enzyme impliqués dans la réaction et dans la reconnaissance du substrat, et modifie, d'autre part, la distribution de charge et la solubilité du substrat. Ainsi le pH peut, en modifiant le mécanisme réactionnel, l'affinité enzyme-substrat et l'accessibilité des liaisons peptidiques du substrat par l'enzyme, modifier significativement la catalyse enzymatique.
Selon le pH de la réaction, les liaisons peptidiques du substrat sont clivées plus ou moins rapidement. Pour un système enzyme-substrat donné, des hydrolysats de DH similaires, mais obtenus à des valeurs différentes de pH, ne possèdent pas des propriétés fonctionnelles identiques (Adler-Nissen, 1982). A un DH donné, le pH ne semble toutefois pas affecter les propriétés fonctionnelles des hydrolysats lorsque les hydrolyses sont réalisées à de faibles ratios enzyme/substrat (Adler-Nissen, 1986).

III.1.2.2. La température.

Lorsque l'influence de la température est observée sur l'activité protéolytique, les résultats présentent le plus souvent une courbe typique en « cloche » ou en « plateau ». Ce phénomène,

caractéristique de toutes les cinétiques enzymatiques, provient de la double influence, antagoniste, de la température. D'une part, comme pour toute réaction chimique, l'augmentation de la température active la cinétique de la réaction. D'autre part, les enzymes, qui sont des molécules protéiques, sont thermosensibles et donc irréversiblement dénaturées aux températures élevées. La compétition entre ces deux contributions opposées de la température a introduit la notion de température optimale. Dans le cadre d'applications industrielles, le choix de la température est souvent un compromis entre la vitesse de catalyse et l'inactivation maximale acceptée dans le procédé (Godon, 1996). Les protéases, dans leur grande majorité, catalysent des réactions pour des températures comprises entre 20 °C et 75 °C mais leur température optimale varie en fonction du pH et du ratio enzyme/substrat (Constantinides et Adu-Amankwa, 1980).

L'activation et l'inactivation thermique des protéases peuvent généralement être décrites par l'équation d'Arrhenius, $k = k_0 e^{-Ea/RT}$ avec k, constante de vitesse (mn^{-1}), k_0, constante de vitesse initiale (mn^{-1}), Ea, énergie d'activation (J/mol), T, température (°K) et R, constante des gaz parfaits (8,31 J/mol.K) (Constantinides et Adu-Amankwa, 1980).

III.1.2.3. La concentration initiale en protéines (So) et en enzyme (Eo).

Les valeurs de la concentration initiale en protéines (So) utilisées dans les procédés d'hydrolyse sont très variables d'une publication à l'autre. Les études cinétiques classiques sont généralement réalisées à de faibles So (< 20 g/L) alors que les hydrolyses à l'échelle industrielle sont conduites à des concentrations plus élevées (entre 20 et 200 g/L). Pour Adler-Nissen (1987), une concentration de 80 g/L est typique.

La concentration initiale en enzyme (Eo) est aussi un paramètre important puisque plus elle est élevée, plus la réaction d'hydrolyse est rapide. Dans un système où l'enzyme est saturée par le substrat, la vitesse réactionnelle est généralement proportionnelle à la concentration initiale en enzyme.

Enfin, il a déjà été montré que, pour de très faibles ratios Eo/So, le mécanisme d'hydrolyse semble différer de celui obtenu pour d'autres ratios Eo/So ; en effet, l'enzyme semble présenter une spécificité plus étroite (Gonzàlez-Tello *et al.*, 1994a ; Adler-Nissen, 1987) .

III.1.2.4. Les autres paramètres opératoires.

La force ionique et la teneur en eau influencent l'activité enzymatique. Toutefois, les modifications de l'activité protéolytique engendrées par ces facteurs sont généralement faibles et, par conséquent, elles sont négligées (Godon, 1996).
Un autre facteur a prendre en compte lors des procédés de protéolyse est le risque de contamination bactérienne. En effet, les conditions de pH et de température sont souvent favorables au développement de microorganismes, d'où l'introduction possible d'agents pathogènes dans le mélange peptidique (Lahl et Braun, 1994).

III.1.2.5. Le degré d'hydrolyse (DH).

Par hydrolyse de protéines de soja ou de pois avec l'Alcalase, Adler-Nissen (1982) et Márquez et Fernández (1998) ont montré qu'à un pH donné, le DH conditionne à lui seul les propriétés fonctionnelles des hydrolysats et ceci quelles que soient les valeurs de la température, de So et du ratio Eo/So choisies pour l'hydrolyse et quelle que soit la durée de l'hydrolyse. Il existe tout de même quelques contraintes ; l'enzyme doit être saturée par le substrat au cours de l'hydrolyse, la température ne doit pas provoquer de changements de conformation du substrat, et une seule protéase doit être impliquée dans l'hydrolyse. Ainsi, pour ces auteurs, le DH (et non la durée) est le meilleur paramètre pour contrôler la réaction et le meilleur indice pour arrêter la réaction.
Adler-Nissen (1982) a mis au point une méthode empirique permettant de déterminer les paramètres influençant les propriétés fonctionnelles de l'hydrolysat à un DH donné. Cette méthode permet d'optimiser plus facilement les procédés d'hydrolyse, en particulier ceux à l'échelle pilote, en discriminant les paramètres opératoires non significatifs. Cette méthode, appelée la méthode $\theta(h)$, est basée sur la comparaison entre une courbe d'hydrolyse obtenue dans des conditions standard de concentration en substrat, de concentration en enzyme, de température et de pH, et les courbes d'hydrolyse obtenues pour d'autres conditions opératoires.

III.1.3. Les méthodes de contrôle de l'hydrolyse.

Le DH permet de caractériser l'étendue de la dégradation hydrolytique des protéines. Comme expliqué précédemment, il est considéré comme étant l'indicateur le plus pratique et le plus

convenable pour le contrôle des procédés d'hydrolyse (Mahmoud, 1994 ; Adler-Nissen, 1982, 1987). Le DH peut être déterminé :

- soit en quantifiant l'azote non-protéique (méthode à l'acide trichloroacétique (TCA)),
- soit en titrant directement les groupements aminés libérés au cours de l'hydrolyse (méthode au formol) (Juffs, 1975, cité par Spellman *et al.*, 2003),
- soit en utilisant des composés qui réagissent spécifiquement avec les groupements aminés pour former des chromophores qu'il est possible de quantifier (méthode à l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), à la ninhydrine et à l'orthophtaldialdéhyde (OPA) (Adler-Nissen, 1979 ; Doi *et al.*, 1981 ; Church *et al.*, 1985),
- soit en titrant les protons libérés au cours de l'hydrolyse (méthode du pH-Stat),
- soit en mesurant l'augmentation de l'osmolalité de l'hydrolysat au cours de la réaction (méthode de l'osmométrie).

Selon la méthode utilisée, le DH est défini soit comme étant le ratio entre l'azote non-protéique et l'azote total, soit comme étant le pourcentage du nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre de liaisons peptidiques totales (Mahmoud, 1994).

Ces méthodes diffèrent selon leur complexité de mise en oeuvre, leur précision et leur sensibilité. De plus, les valeurs de DH ne sont pas directement comparables d'une méthode à l'autre (Spellman *et al.*, 2003 ; Panasiuk *et al.*, 1998). Toutefois, comme cela est montré dans le tableau B.III.3, il existe, en règle générale, une bonne corrélation entre les valeurs de DH obtenues par les différentes méthodes (Panyam et Kilara, 1996 ; Mutilangi *et al.*, 1995).

Tableau B.III.3 : méthodes de mesure du DH qui ont fait l'objet d'une corrélation entre-elles.

Méthode 1	**Méthode 2**	**Système protéine/enzyme**	**Coefficient R^2**	**Référence**
pH-Stat	TCA	Lait/trypsine Lait/alcalase	- -	Margot *et al.* (1994) Boudrant et Cheftel (1976)
TNBS	OPA	Pois/trypsine	0,96	Panasiuk *et al.* (1998)
TNBS	ninhydrine	Pois/trypsine	0,90	Panasiuk *et al.* (1998)
pH-Stat	TNBS	Soja/alcalase	0,99	Henn et Netto (1998)
pH-Stat	OPA	Ovalbumine/(trypsine-chymotrypsine)	0,98 à pH 7,5 0,99 à pH 8 0,99 à pH 8,5	Van der Plancken *et al.* (2003)
pH-Stat	OPA	Blanc d'oeuf/(trypsine-chymotrypsine)	0,95 à pH 7,5 0,98 à pH 8 0,98 à pH 8,5	Van der Plancken *et al.* (2003)
pH-Stat	TNBS	Viande et os/protéase	0,99	Linder *et al.* (1995)
pH-Stat	osmométrie	Viande et os/protéase	0,90	Linder *et al.* (1995)
PH-Stat	ninhydrine	Gruau de blé	-	Kammoun *et al.* (2003)

Enfin, d'après les travaux de Spellman *et al.* (2003), les méthodes employées sont plus ou moins bien adaptées selon le système enzyme/substrat utilisé. Par exemple, la méthode du pH-

Stat surestimerait les valeurs de DH lors de l'utilisation d'une exopeptidase et la méthode à l'OPA serait peu adaptée aux protéines de lait.

III.1.3.1. Méthode au TCA et méthode de la dialyse.

Ces méthodes permettent de caractériser l'étendue de l'hydrolyse en quantifiant l'azote non protéique libéré au cours de la réaction (Margot *et al.*, 1997). La méthode au TCA s'appuie sur la quantification de l'azote non-protéique soluble dans une solution d'acide trichloroacétique. Le DH peut alors être calculé par la formule suivante :

$$DH\ (\%) = \frac{(D_t - D_o)}{(D_{max} - D_o)} \times 100$$

D_o : azote non protéique soluble présent dans le substrat non hydrolysé,
D_{max} : azote non protéique soluble total après hydrolyse acide des protéines,
D_t : azote non protéique au temps t (corrigé par la présence de l'azote non protéique présent dans la préparation enzymatique).

L'hydrolyse des protéines dans un sac de dialyse aux pores de taille moléculaire choisie (généralement 1000 Da) permet la diffusion des petites molécules azotées vers le dialysat. Il est alors possible de calculer un degré de digestibilité des protéines par l'équation suivante (Vorob'ev *et al.*, 1996) :

$$\text{Degré de digestibilité } (\%) = \frac{\text{Azote dans le dialysat}}{\text{Azote total}} \times 100$$

Les méthodes au TCA ou de la dialyse présentent le désavantage de ne pas être directement liées à la réaction elle-même (Adler-Nissen, 1986, 1987).

III.1.3.2. Méthodes au TNBS, à l'OPA et à la ninhydrine.

Ces méthodes se basent sur la mesure des groupements α-aminés libérés au cours de l'hydrolyse et elles permettent ainsi de déterminer le nombre de liaisons peptidiques clivées (Adler-Nissen, 1987). Le degré d'hydrolyse est alors calculé comme étant le nombre de liaisons peptidiques clivées (h) sur le nombre total de liaisons peptidiques (h_{tot}).

$$DH\ (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

h : nombre de liaisons peptidiques clivées, méqv/g protéine
h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques, méqv/g protéine

Le nombre total de liaisons peptidiques par unité de masse, h_{tot}, pour une protéine donnée, peut être calculé suivant sa composition en acides aminés. Pour la majorité des protéines alimentaires, la masse molaire moyenne des résidus acides aminés est de l'ordre de 125 g/mole, ce qui donne un h_{tot} d'environ huit équivalents par kg de protéines (calculé en azote Kjeldahl, N × 6,25) (Novo Enzymes ; Adler-Nissen, 1987). Les valeurs précises de h_{tot} pour un certain nombre de protéines alimentaires communes sont données dans le tableau B.III.4.

Tableau B.III.4 : facteur de conversion Kjeldahl et nombre de liaisons peptidiques pour différentes protéines alimentaires (Novo Enzymes, 1988 ; * : Rozan *et al.*, 1997).

Protéine	**Facteur de conversion Kjeldahl, f_N**	**h_{tot} en meqv / g, ($N \times f_N$)**
Caséine	6,38	8,2
Viande	6,25	7,6
Muscle de poisson	6,25	7,3
Blanc d'œuf	6,25	8,0
Gélatine	5,55	11,1
Farine, concentrat et isolat de soja	6,25	7,8
Graine de coton	6,25	7,6
Protéines de blé	5,7	8,3
Tourteau de colza *	6,25	8,0

Les groupements α-aminés sont quantifiés par spectrophotométrie après réaction avec le réactif d'intérêt (TNBS, OPA ou ninhydrine). La figure B.III.2 présente la réaction du TNBS avec les groupes α-aminés et la formation du chromophore.

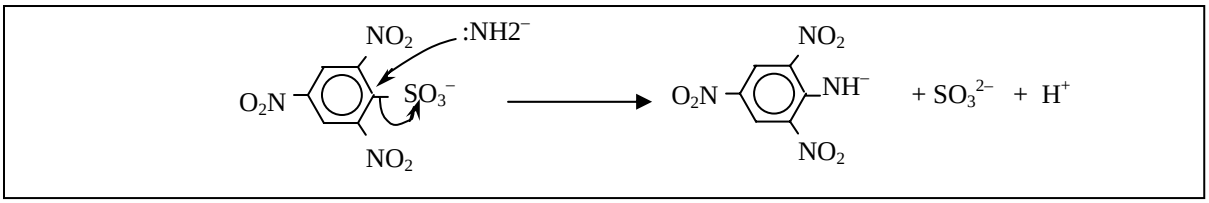


Figure B.III.2 : réaction du TNBS avec un groupe α-aminé et formation du chromophore (Adler-Nissen, 1979).

La méthode à l'OPA est une méthode fluorimétrique très sensible qui présente l'avantage d'être simple et rapide. Cependant, une certaine variabilité de l'intensité de fluorescence et la faible stabilité des dérivés produits sont les principaux désavantages de cette méthode. L'OPA présente aussi l'inconvénient de ne réagir que faiblement avec la cystéine et de ne pas réagir avec la proline (Silvestre, 1997).

La méthode à la ninhydrine est aussi une méthode très sensible mais elle possède beaucoup de désavantages ; la ninhydrine est sensible à l'oxygène, l'ammoniaque interfère, la valeur du blanc est souvent très élevée et la méthode est longue (Silvestre, 1997).

La méthode au TNBS n'est pas influencée par la nature des protéines et de l'enzyme mais elle requiert de longues étapes d'incubation (1 h) et de refroidissement (30 mn) (Spellman *et al.*, 2003). Le manque de réactivité du TNBS à l'encontre de la proline et de l'hydroxyproline ainsi que la capacité du TNBS à réagir avec le groupe ε-aminé de la lysine sont responsables d'une légère déviation des valeurs de DH (Silvestre, 1997).

III.1.3.3. Méthode du pH-Stat.

La technique du pH-Stat est basée sur le maintien du pH constant par titration continue et automatique des protons libérés au cours de l'hydrolyse (figure B.III.3).

Ouverture de la liaison peptidique : $\text{-CHR-CO-NH-CHR'-} + H_2O \xrightarrow{\text{protéase}} \text{-CHR-COOH} + NH_2\text{-CHR'}$

Echange de proton : $\text{-CHR-COOH} + NH_2\text{-CHR'} \longrightarrow \text{-CHR-COO}^- + NH_3^+\text{-CHR'}$

Titration des groupes aminés : $NH_3^+\text{-CHR'} + OH^- \rightleftharpoons NH_2\text{-CHR'} + H_2O$

Figure B.III.3 : hydrolyse d'une liaison peptidique par catalyse enzymatique et principe du pH-Stat (Novo Enzymes, 1988).

La relation entre le DH et la consommation de base est donnée par l'équation qui suit, le degré moyen de dissociation des groupements α-aminés étant fonction du pH et de la température de la réaction (Adler-Nissen, 1982, 1987).

$$DH\ (\%) = \frac{B \times N_b}{\alpha \times Mp \times h_{tot}} \times 100$$

B : consommation de base (mL)
N_b : normalité de la base (N)
α : degré moyen de dissociation de groupements α-aminés
h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques du substrat protéique (méqv/g protéines)
Mp : masse de protéine (N × facteur de Kjeldahl) (g)

La méthode du pH-Stat a l'avantage d'être utilisable en continu et donc de permettre un suivi direct des cinétiques d'hydrolyse. Cependant, les valeurs de DH obtenues par cette méthode sont relatives et doivent être vérifiées par d'autres méthodes (Van der Plancken *et al.*, 2003 ; Godon, 1996). C'est la méthode la plus employée dans l'industrie parce qu'elle est connue pour sa haute reproductibilité et ses propriétés non dénaturantes (Diniz et Martin, 1996).
Le pH joue un rôle important dans la calibration de la méthode. En effet, Van der Plancken *et al.* (2003) ont établi trois calibrations différentes, à trois pH différents, entre la méthode du pH-Stat et celle à l'OPA (tableau B.III.3).

III. 1.3.4. Méthode de l'osmométrie.

En mesurant l'abaissement du point de congélation de la solution protéique au cours de l'hydrolyse, l'utilisation de la conductivité couplée à l'osmolalité d'une solution permet d'obtenir une rapide estimation du DH. Bien qu'elle soit très efficace, cette méthode est très rarement utilisée (Adler-Nissen, 1987). Le DH est calculé grâce à l'équation suivante :

$$DH\ (\%) = \frac{\Delta C \times (100 - D)}{So \times \omega \times h_{tot} \times 1000} \times 100$$

ΔC : variation de l'osmolalité (milli-osmole)
ω : coefficient osmotique
So : concentration en protéines (%)
D : taux de matière sèche (%)

III.1.4. Les procédés de mise en œuvre de l'hydrolyse.

Les hydrolyses à l'échelle industrielle ou pilote sont généralement réalisées en réacteur discontinu (Lahl et Braun, 1994). En règle générale, les hydrolysats produits à l'échelle industrielle possèdent des caractéristiques similaires à ceux produits à l'échelle laboratoire (Cai *et al.*, 1996). Les réacteurs discontinus présentent plusieurs désavantages qui peuvent être, en partie, limités par l'utilisation de réacteurs continus.

III.1.4.1. Réacteurs discontinus.

Les réacteurs discontinus sont des procédés lents avec des rendements faibles et coûteux puisque l'enzyme n'est pas réutilisée et la quantité d'enzyme utilisée est généralement élevée (Chiang *et al.*, 1999 ; Deeslie et Cheryan, 1981). De plus, ils nécessitent, en fin de réaction, une étape d'inactivation de l'enzyme, soit en portant le mélange réactionnel à une température élevée afin de dénaturer thermiquement la protéase, soit en ajustant les conditions de pH et de température aux valeurs pour lesquelles la protéase se dénature, soit en éliminant les enzymes de l'hydrolysat par des méthodes de filtration ou d'ultrafiltration, soit encore en ajoutant un inhibiteur de la protéase utilisée (Lahl et Braun, 1994 ; Simpson *et al.*, 1998). Ces traitements sont également coûteux.

Les produits générés par ce type de réacteur ne sont pas homogènes en taille. Si l'objectif de l'hydrolyse est d'obtenir des petits peptides, l'hydrolyse multi-enzymatique permet d'améliorer le procédé. En effet, par sélection d'une combinaison appropriée d'enzymes possédant des profils d'activité complémentaires, il est possible de moduler la quantité et la

diversité des peptides de faible masse molaire présents dans l'hydrolysat (Gilmartin et Jervis, 2002). L'utilisation de systèmes faisant intervenir plusieurs enzymes augmente les rendements en réduisant l'effet de spécificité des enzymes (Lacroix *et al.*, 1983a, 1983b ; Morato *et al.*, 2000).

III.1.4.2. Réacteurs continus.

Parmi les réacteurs continus mis en œuvre pour hydrolyser des protéines, les plus utilisés sont les réacteurs à membrane, c'est-à-dire couplés à une unité d'ultrafiltration, et les réacteurs à enzymes immobilisées. Ils sont respectivement schématisés dans les figures BIII.4 et B.III.5.

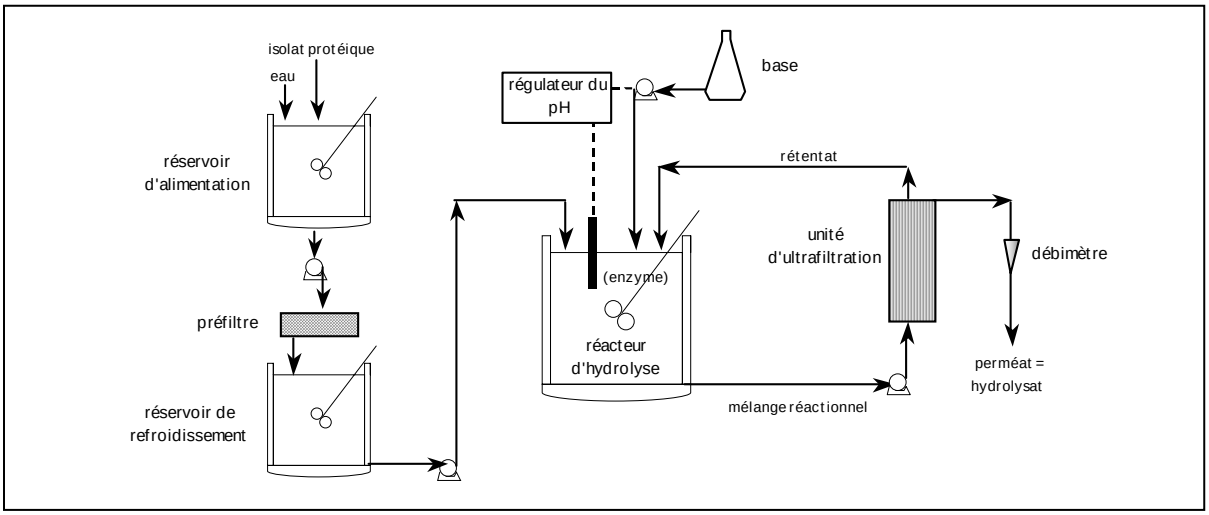


Figure B.III.4 : schéma d'un procédé d'hydrolyse utilisant un réacteur couplé à une unité d'ultrafiltration (Deeslie et Cheryan, 1981).

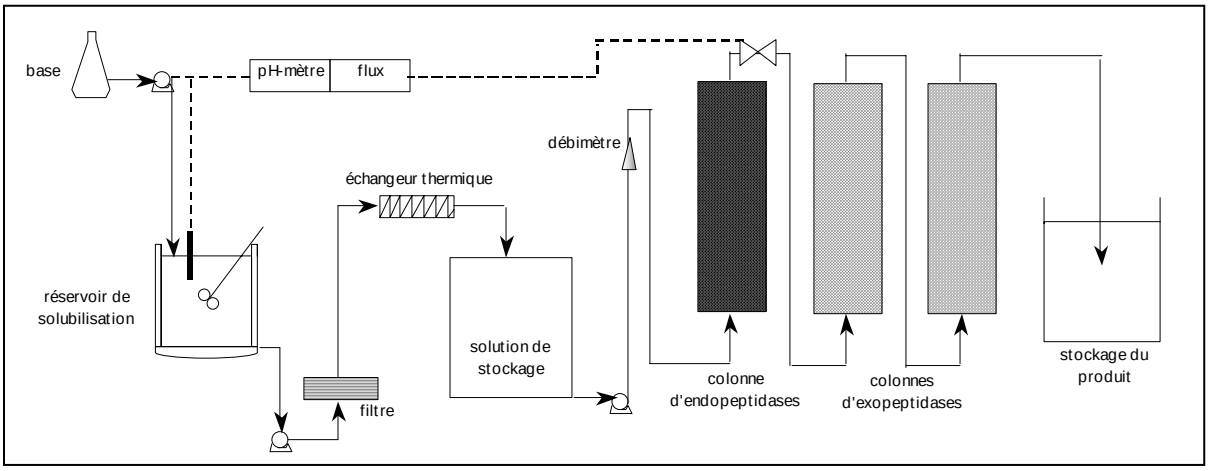


Figure B.III.5 : exemple d'un procédé en continu pour l'hydrolyse de protéines alimentaires avec des enzymes immobilisées (réacteur en colonne), développé par Ge *et al.* (1996) pour l'hydrolyse intensive de caséine.

Dans les procédés à réacteur à membrane (figure B.III.4), la réaction d'hydrolyse s'effectue dans un réacteur à pH et température constants ; une partie du mélange réactionnel est alors dirigée à débit constant vers une unité d'ultrafiltration. Les petits peptides et acides aminés sont séparés du mélange réactionnel en passant à travers la membrane et se retrouvent dans le perméat, tandis que les molécules ne traversant pas la barrière membranaire (protéines partiellement hydrolysées et protéase) sont redirigées vers le réacteur. Un système régule alors le volume du mélange réactionnel du réacteur par ajout de substrat frais afin d'être à volume constant dans le réacteur.

Par rapport aux réacteurs discontinus, les réacteurs à membrane permettent d'augmenter l'efficacité d'utilisation de l'enzyme (recyclage), d'augmenter la productivité (quantité de l'hydrolysat / quantité d'enzyme) du réacteur (de 10 à 20 fois) et d'obtenir des produits peptidiques relativement uniformes en taille moléculaire (Perea et Ugalde, 1996 ; Cheryan et Deeslie, 1983 ; Deeslie et Cheryan, 1981).

Pour ce type de réacteur, il est souvent observé, d'une part, un colmatage progressif de la membrane d'ultrafiltration dû à l'augmentation continuelle, dans le réacteur, de polypeptides de hautes masses molaires non hydrolysables (Belhocine *et al.*, 2000 ; Perea et Ugalde, 1996) et, d'autre part, une diminution de l'activité du réacteur due à une fuite de l'enzyme à travers la membrane (jusqu'à ≈ 25 %) et à une dénaturation de l'enzyme lorsque celle-ci s'adsorbe sur la membrane (Lin *et al.*, 1997 ; Perea et Ugalde, 1996 ; Boudrant et Cheftel, 1976). Cette diminution dépend, en fait, des types d'enzyme et de membrane utilisés puisque, par exemple, Prevot-D'Alvise *et al.* (2004) n'ont observé ni fuite ni perte d'activité de l'enzyme lors de l'hydrolyse de protéines de luzerne dans un réacteur à membrane.

Les procédés membranaires sont particulièrement intéressants pour la production de peptides biologiquement actifs (Prevot-D'Alvise *et al.*, 2004 ; Bordenave *et al.*, 1999, 2000) et d'hydrolysats hypoallergéniques (Lin *et al.*, 1997). Le degré d'hydrolyse, la spécificité de l'enzyme et le seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration sont les principaux facteurs dictant la composition de l'hydrolysat (Chiang *et al.*, 1999).

Dans les procédés à réacteur à enzymes immobilisées, la réaction a lieu dans une colonne perfusée par un courant de réactif (substrat protéique) dans laquelle les enzymes sont immobilisées par liaisons covalentes, ioniques ou par adsorption sur des supports naturels ou synthétiques (silice, agarose, polyamides…). Le produit de la réaction est entraîné au fur et à mesure de sa formation en dehors de la colonne. Plusieurs réacteurs successifs peuvent être installés comme illustré dans le schéma de la figure B.III.5 (Pelmont, 1995). Les réacteurs à

enzymes immobilisées sont de plus en plus utilisés pour leur productivité élevée et une bonne rentabilité mais ils restent encore peu développés dans l'industrie (Tardioli *et al.*, 2003 ; Ferreira *et al.*, 2003). Cependant, deux inconvénients de ces réacteurs sont bien identifiés ; tout d'abord, les enzymes peuvent partiellement perdre leur activité protéolytique lors de leur immobilisation ou lors de la réaction (dénaturation, problèmes stériques et/ou problèmes de limitation diffusionnelle du substrat) et, par ailleurs, le support se colmate (Coutouly, 1991 ; Shah *et al.*, 1995 ; Ge *et al.*, 1996).

III.2. MODELISATION DE L'HYDROLYSE DANS DES REACTEURS DISCONTINUS.

Les procédés d'hydrolyse de protéines requièrent un certain contrôle afin d'obtenir, de manière reproductible, des hydrolysats ou des peptides possédant les propriétés d'intérêt (Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, 2003). Les modèles simulant les cinétiques d'hydrolyse sont des outils intéressants pour ce contrôle (Hardwick et Glatz, 1989). Ils permettent de prédire l'influence des paramètres opératoires sur l'hydrolyse (Adler-Nissen, 1978).
Cependant, la protéolyse est un processus à multiples substrats puisqu'elle implique, d'une part, l'hydrolyse de multiples liaisons peptidiques de réactivités différentes et, d'autre part, le démasquage de ces liaisons peptidiques. Ainsi, le substrat est hydrolysé par une succession de réactions qui s'effectuent soit en série, soit en parallèle (Adler-Nissen, 1987). D'autres phénomènes comme l'inhibition de l'enzyme par les produits d'hydrolyse, par le substrat, par des inhibiteurs de protéase ou par des molécules non-protéiques ou, encore, l'inactivation de l'enzyme, rendent ces réactions d'hydrolyse très complexes.
Dans cette partie, nous ne nous intéresserons qu'aux réacteurs discontinus.

III.2.1. Mécanismes de type « zipper » ou de type « one-by-one ».

La protéolyse peut s'effectuer soit séquentiellement, c'est-à-dire protéine par protéine, générant ainsi des hydrolysats composés de protéines natives et de petits peptides, soit simultanément sur l'ensemble des protéines du mélange réactionnel entraînant la formation de longs peptides intermédiaires et de petits peptides. Ces deux types de mécanisme, schématisés dans la figure B.III.6, sont respectivement appelés de type « one-by-one » et de type « zipper » (Panyam et Kilara, 1996 ; Adler-Nissen, 1987).

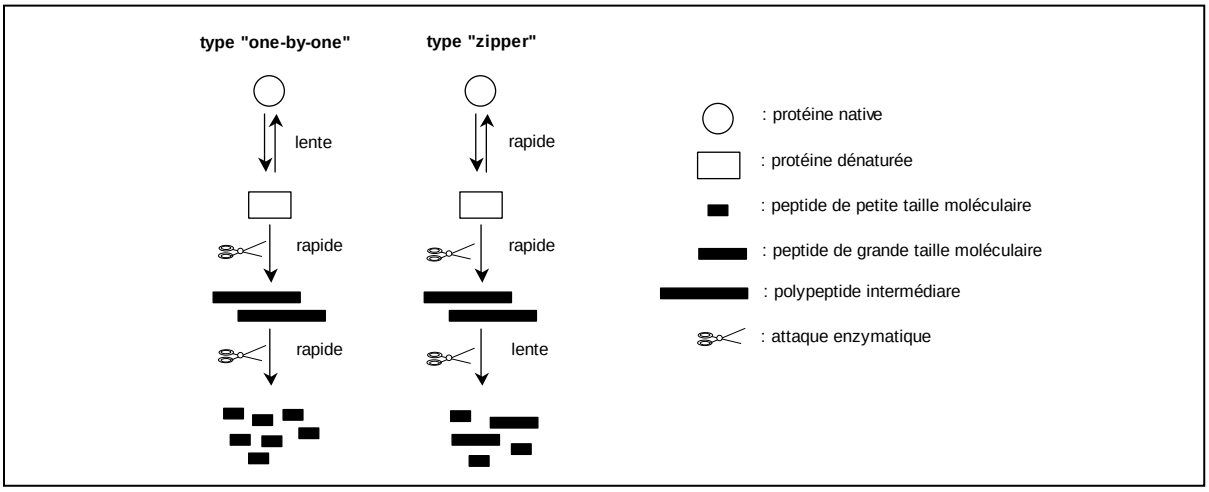
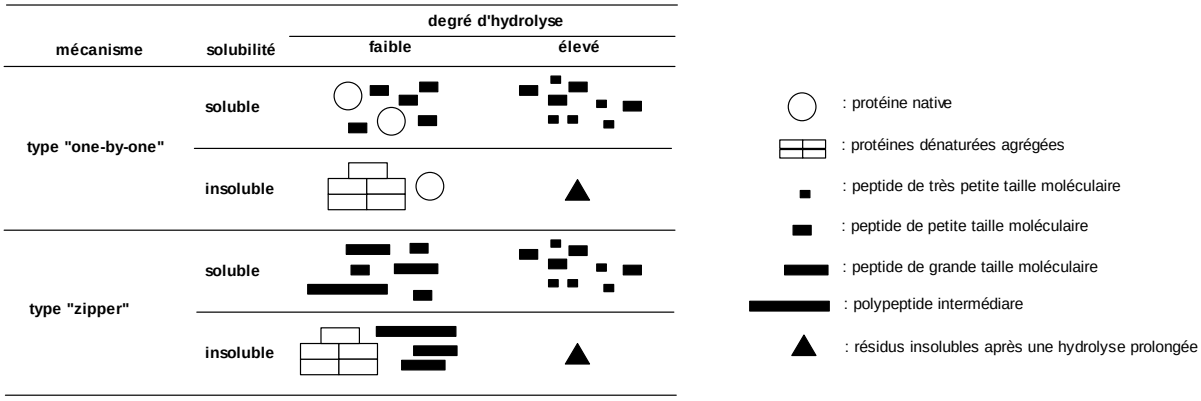


Figure B.III.6 : schémas des mécanismes de type one-by-one et de type zipper (tiré de Adler-Nissen, 1976).

D'un point de vue qualitatif, la composition des hydrolysats protéiques varie en fonction du mécanisme d'hydrolyse, du degré d'hydrolyse et de la solubilité du substrat. Les différentes compositions possibles sont schématisées dans le tableau B.III.5. A faible degré d'hydrolyse, la composition des produits d'hydrolyses varie fortement entre les deux types de mécanismes. En conséquence, les propriétés fonctionnelles diffèrent selon le type de mécanisme impliqué lors de la protéolyse (Adler-Nissen, 1976).

Tableau B.III.5 : composition qualitative des hydrolysats protéiques en fonction du mécanisme d'hydrolyse, du degré d'hydrolyse et de l'état de solubilité du substrat (Adler Nissen, 1976).



D'un point de vue cinétique, la protéolyse peut être simplifiée en un processus en deux étapes, incluant le démasquage des liaisons peptidiques (B_m) dans la première phase et l'hydrolyse des liaisons démasquées (B_d) dans la seconde phase (Vorob'ev *et al.*, 1986, 1996) :

$$B_m \xrightarrow{k_d} B_d \xrightarrow{k_h} N$$

k_d : constante de démasquage,
k_h : constante de vitesse des liaisons peptidiques démasquées,
B_m : liaisons peptidiques masquées,
B_d : liaisons peptidiques démasquées,
N : azote aminé, produit de la réaction.

Le ratio k_d/k_h est le paramètre cinétique qui décrit l'influence de l'étape de démasquage sur l'ensemble du processus d'hydrolyse. Une faible valeur de k_d/k_h est attribuée au mécanisme « one-by-one » tandis qu'une valeur élevée de k_d/k_h indique une protéolyse de type « zipper » (Vorob'ev *et al.*, 1996).

Selon le système enzyme/substrat, le type de mécanisme prédominant diffère. Par exemple, l'hydrolyse des protéines de gluten de maïs par cinq protéases différentes suit un mécanisme de type « one-by-one » (Behnke *et al.*, 1989) tandis que celui des protéines de soja par la bromélaine et la pomiférine est de type « zipper » (Molina Ortiz et Wagner, 2002 ; Ortiz et Añón, 2000). Cependant, dans la plupart des cas, la protéolyse est régulée par les deux types de mécanisme (Adler-Nissen, 1976 ; Ortiz et Añón, 2000). De plus, Vorob'ev *et al.* (1986) ont également mis en évidence que le type de mécanisme diffère selon la concentration initiale en substrat.

En règle générale, les protéines de plantes sont plus « résistantes » à l'action hydrolytique des enzymes par rapport aux protéines d'origine animale (Vorob'ev et al., 1996).
La susceptibilité à l'hydrolyse de diverses globulines 11-12S natives a été caractérisée en utilisant différentes enzymes (trypsine, subtilisines, pronase E). Il a été montré que la dégradation enzymatique de ces protéines est très limitée (Godon, 1996 ; Adler-Nissen, 1976). La structure globulaire et compacte des globulines est à l'origine d'une telle dégradation. En effet, seuls les polypeptides acides hydrophiles et localisés à la surface de la molécule sont clivés lors de l'action protéolytique (Van der Plancken et al., 2003 ; Adler-Nissen, 1976). Le type de protéine végétale considéré est également important. En effet, Ortiz et Añón (2000) ont montré que les protéases clivent préférentiellement les albumines 7S aux globulines 11S du soja, et que les albumines subissent une dégradation plus importante que les globulines.

III.2.2. Modèles empiriques et phénoménologiques de la protéolyse.

Il existe différents types de modèle classés selon leur structure ou l'objectif défini. Quel que soit le modèle utilisé, il est admis que, dans un réacteur discontinu agité et thermostaté, le mélange réactionnel est homogène, c'est-à-dire que les variations de concentration en enzyme, de concentration en substrat, de température et de pH dans le mélange sont modérées ou négligeables. Les concentrations en substrat ou en produit dans les équations de vitesse sont

généralement exprimées soit en fonction du nombre de liaisons peptidiques clivables soit en fonction du DH (Sousa *et al.*, 2004).

L'équation bilan du substrat dans un bioréacteur discontinu est alors de la forme :

$$-\int_{So}^{Sf} dS = \int_{0} r.dt$$

So : concentration initiale en substrat dans le réacteur
Sf : concentration finale en substrat dans le réacteur
r : vitesse de la réaction
tf : temps final de la réaction

III.2.2.1. Généralités sur les modèles.

Un modèle est une description mathématique d'un processus permettant de simuler son comportement et de prédire son évolution. Les deux types de modèles les plus rencontrés sont les modèles comportementaux et les modèles phénoménologiques.

Le modèle comportemental, aussi appelé empirique ou de type « boîte noire », se limite à reproduire un comportement sans analyse du processus ayant généré les données. Il apporte peu de renseignements sur les principaux phénomènes accompagnant le processus. Sa structure ne prétend en rien correspondre à celle du processus étudié, ne suscitant donc pas de connaître les unités des paramètres. Ce type de modèle utilise, en général, des séries de fonctions simples ou des polynômes du second degré. Enfin, sa capacité de prédiction est limitée et restreinte au domaine d'identification des paramètres.

A l'inverse, le modèle phénoménologique, basé sur la connaissance, reproduit un comportement après une analyse rigoureuse des phénomènes et facteurs accompagnant le processus. Il s'établit sous la forme de bilans mettant en jeu les grands principes de la physique (cinétique, thermodynamique, transfert…). Ce type de modèle est basé sur la prise en compte des processus limitants après identification de la valeur physique des différents coefficients.

De par la complexité de son mécanisme réactionnel, la protéolyse est plus souvent modélisée à partir de modèles empiriques ou contrôlée à partir d'abaques (Margot *et al.*, 1997).

III.2.2.2. Abaques du contrôle de l'hydrolyse.

Plusieurs travaux ont mis en évidence une relation linéaire entre le DHt (DH à un temps donné) et le logarithme de la concentration initiale en enzyme. Cette relation a été retrouvée lors de l'hydrolyse de protéines de crustacé (Baek et Cadwallader, 1995 ; Simpson *et al.*, 1998), de poisson (Kristinsson et Rasco, 2000a ; Guérard *et al.*, 2001 ; Guerard *et al.*, 2002) et

de blé. Baek et Cadwallader (1995) ont également trouvé une relation linéaire entre le logarithme du DHt et le logarithme de la quantité de protéase pour les systèmes protéines d'écrevisses – papaïne ou bromélaïne.
Ces relations, retrouvées pour différentes protéases sur un même substrat, permettent de comparer les enzymes selon leur efficacité catalytique et, ainsi, selon un critère de coût. En effet, de tels abaques permettent de calculer la quantité d'enzyme nécessaire pour atteindre un DHt donné (Kristinsson et Rasco, 2000a).

III.2.2.3. Modèles comportementaux de la protéolyse.

La méthode des surfaces (response surface methodology ou RSM) est une méthode souvent retenue pour contrôler le processus de l'hydrolyse de protéines comme cela a été réalisé pour des protéines de poisson (Baek et Cadwallader, 1995 ; Diniz et Martin, 1996) ou pour des protéines de viande/os (Linder *et al.*, 1995). Cette méthode comprend un ensemble de procédures mathématiques et statistiques qui sont utilisées pour étudier les relations entre une réponse (variable dépendante : DH, solubilité azotée…) et les facteurs de l'hydrolyse (variables indépendantes correspondant aux paramètres réactionnels). Cette méthode génère des modèles mathématiques qui permettent de simuler l'influence des paramètres opératoires sur le DH et d'optimiser ces paramètres pour atteindre un DH donné.

Le tableau B.III.6 présente quelques modèles empiriques trouvés dans la littérature. Ces modèles comportent généralement entre deux et quatre paramètres à identifier. Certains modèles empiriques expriment la vitesse d'hydrolyse en fonction du temps (modèles 1 et 2) tandis que d'autres l'expriment en fonction de la quantité d'azote soluble (modèles 3 et 4). Les fonctions les plus courantes sont de type inverse (modèles 1 et 3) ou de type exponentiel (modèles 2 et 4). Le modèle 4, développé par González-Tello *et al.* (1994a, 1996), a été utilisé avec succès pour modéliser la cinétique d'hydrolyse de divers systèmes enzyme/substrat (Márquez et Vázquez, 1999 ; González-Tello *et al.*, 1994a ; Margot *et al.*, 1997 ; Linder *et al.*, 1995 ; Moreno et Cuadrado, 1993).
En règle générale, les valeurs modélisées par des modèles comportementaux entraînent des déviations par rapport aux données expérimentales (Margot *et al.*, 1997). Par exemple, chaque modèle présenté dans le tableau B.III.6 simule plus ou moins correctement les cinétiques suivant les conditions réactionnelles et les phénomènes susceptibles d'être impliqués ; les modèles 1 et 3 simulent convenablement les hydrolyses où l'enzyme est inhibée par les

produits d'hydrolyse alors que le modèle 4 simule avec précision les hydrolyses où l'enzyme est inactivée par dénaturation thermique.

Tableau B.III.6 : quelques modèles empiriques simulant l'hydrolyse enzymatique (Margot *et al.*, 1997).

Modèle empirique	**N°**
$\frac{dX}{dt} = \frac{a_1 a_2}{(a_2 + t)^2} + a_3$	1
$\frac{dX}{dt} = a_1 a_2 \exp(-a_2 t) + a_3 a_4 \exp(-a_4 t)$	2
$\frac{So\, dX}{Eo\, dt} = \frac{a_1 So(a_4 - X)}{a_2 + So(a_4 - X) + 2a_3 So_2 (X - Xo)(a_4 - X)}$	3
$\frac{dX}{dt} = a_1 \frac{Eo}{So^2} \exp(-a_2 X)$	4

X : fraction d'azote soluble; t : temps ; a_i : paramètres i du modèle ; So : concentration initiale en substrat ; Eo : concentration initiale en enzyme.

III.2.2.4. Modèles phénoménologiques de la protéolyse.

Bien que les modèles traitant de la protéolyse soient majoritairement empiriques, quelques auteurs se sont intéressés à l'élaboration de modèles phénoménologiques. Mais la complexité des phénomènes recensés implique souvent d'importantes hypothèses simplificatrices pour permettre une résolution analytique des équations différentielles élaborées.

En règle générale, les cinétiques d'hydrolyse sont caractérisées par une vitesse initiale élevée suivie d'un ralentissement rapide de la vitesse d'hydrolyse. Les courbes d'hydrolyse ont, en règle générale, une allure asymptotique (Adler-Nissen, 1978). Les modèles phénoménologiques sont, pour la plupart, basés sur le schéma réactionnel de Michaelis-Menten (Postolache et Oncescu, 1989) :

$$\mathbf{E + S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathbf{ES} \xrightarrow{k_2} \mathbf{E + P}$$

E : enzyme
S : substrat
ES : complexe enzyme-substrat
P : produit
k_1, k_2, k_{-1}, k_{-2}: constantes de vitesse

A l'état stationnaire, dans un réacteur discontinu, il en résulte l'équation suivante :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_M \cdot S}{K_M + S} \quad \text{avec} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{et} \quad V_M = k_2 \cdot E_0$$

K_M : constante de Michaelis-Menten (quantité/volume)
V_M : vitesse maximale (quantité/(volume.temps))
S : concentration en substrat (quantité/volume)
P : concentration en produit (quantité/volume)
E_0 : concentration initiale en enzyme (quantité/volume)

La constante de saturation, K_M, reflète l'inverse de l'affinité de l'enzyme sur le substrat. Pour une enzyme donnée, la vitesse maximale, V_M, et la constante K_M, diffèrent selon la nature du substrat et selon le pH et la température de la réaction (Sousa *et al.*, 2004 ; Driou *et al.*, 1985 ; Constantinides et Adu-Amankwa, 1980). Par exemple, Sousa *et al.* (2004) ont montré, par hydrolyse de protéines de lait avec l'Alcalase, que k_2 et K_M diminuent lorsque le pH augmente. La valeur de Km pour les systèmes enzyme/protéine se situe généralement entre 2 et 10 g/L (Adler-Nissen, 1978, 1987). Si la concentration initiale en substrat est environ 10 fois supérieure à Km (généralement So > 40 – 80 g/L), l'enzyme est saturée par le substrat tout au long du processus d'hydrolyse (Adler-Nissen, 1987 ; Mutilangi *et al.*, 1995).
Le rapport k_2/K_M ($k_2=V_M/Eo$) reflète la spécificité de l'enzyme envers un substrat donné et, en conséquence, est considéré comme étant le meilleur paramètre pour comparer l'efficacité des enzymes à l'égard de divers substrats (Postolache et Oncescu, 1989 ; Pelmont, 1995).

La diminution de la vitesse d'hydrolyse en fonction du temps peut être attribuée à différents phénomènes tels que l'inhibition de l'enzyme par les peptides formés ou par le substrat, l'inactivation de l'enzyme par autolyse ou par dénaturation thermique, la limitation du nombre de liaisons peptidiques disponibles (Margot *et al.*, 1997 ; Constantinides et Adu-Amankwa, 1980 ; Guerard *et al.*, 2002).

** Inhibition de l'enzyme par excès de substrat.*

Selon la théorie de Michaelis-Menten, la vitesse de la réaction enzymatique augmente avec la concentration initiale en substrat pour devenir maximale à partir d'une certaine concentration de ce dernier. Une diminution de la vitesse aux concentrations élevées en substrat révèle une inhibition de l'enzyme par excès de substrat. Ce phénomène a été observé lors de l'hydrolyse de protéines de coton par différentes protéases (Arzú *et al.*, 1972), de protéines de soja et de poisson par la Pronase (Driou *et al.*, 1985 ; Deeslie et Cheryan, 1981), de l'hémoglobine par la trypsine (Shi *et al.*, 2004). En règle générale, l'inhibition par le substrat est visible pour des concentrations initiales en substrat supérieures à 10 % (p/v) mais dans le cas des travaux de Deeslie et Cheryan (1981), l'enzyme est inhibée à partir d'une concentration initiale en substrat de 1 - 2 % (p/v).

** Inhibition de l'enzyme par les molécules non-protéiques du substrat.*

Quelques travaux ont mis en évidence l'existence d'inhibiteurs de protéase à sérine dans certaines matières protéiques comme le lait ou le colza (González-Tello *et al.*, 1994 ; Vioque *et al.*, 2001). Cette inhibition dépend de l'enzyme employée puisque, par exemple, les inhibiteurs du colza inhibent l'Alcalase mais n'inhibent pas la Flavourzyme. Ces inhibiteurs (I) se combinent très rapidement avec l'enzyme (E), de manière irréversible ($E + I \rightarrow EI$), diminuant alors la quantité d'enzyme active. D'autres composants non protéiques comme, par exemple, certains composants lipidiques (triglycérides, phospholipides), sont capables d'inhiber les protéases de manière compétitive ou non compétitive ($E + I \Leftrightarrow EI$) (Constantinides et Adu-Amankwa, 1980).

** Modification du substrat protéique.*

Pour certains auteurs, la protéolyse serait le résultat d'un clivage rapide des liaisons peptidiques sensibles à l'hydrolyse lors d'une première phase et d'un clivage plus lent des liaisons peptidiques moins sensibles lors d'une seconde phase (O'Meara et Munro, 1984 ; Vorob'ev *et al.*, 1987a, 1987b). Adler-Nissen (1978) a montré, lors de l'hydrolyse d'un concentrat de protéines de soja avec l'Alcalase, que la diminution de la vitesse d'hydrolyse serait plutôt liée à une différence de réactivité des liaisons peptidiques à l'encontre de la protéase : les liaisons peptidiques seraient clivées des plus réactives au moins réactives. Ainsi, la diminution de la vitesse réactionnelle se reflète par une diminution de V_M (ou de l'efficacité catalytique de l'enzyme) au cours de l'hydrolyse (Vorob'ev *et al.*, 1987b).
Dans les travaux d'Adler-Nissen (1978), Km reste constant. Toutefois, certaines études ont montré que les peptides générés sont caractérisés par des valeurs de Km plus faibles que celle du substrat originel. Il existerait alors une sorte de compétition pour l'enzyme entre le substrat originel et les peptides, sachant que ces derniers sont continuellement produits à partir du premier (Adler-Nissen, 1987 ; Mutilangi *et al.*, 1995).

L'allure des courbes d'hydrolyse a également été expliquée par des phénomènes d'adsorption enzyme/substrat. Par hydrolyse de protéines insolubles de lait, Mutilangi *et al.* (1995) ont montré que la vitesse réactionnelle est limitée par un tel phénomène. Dans ce cas, la vitesse initiale (Vo) est une fonction puissance de Eo/So : $Vo = k\ (Eo/So)^n$, avec k, constante de vitesse et $n < 1$.

** Inhibition de l'enzyme par les produits de l'hydrolyse.*

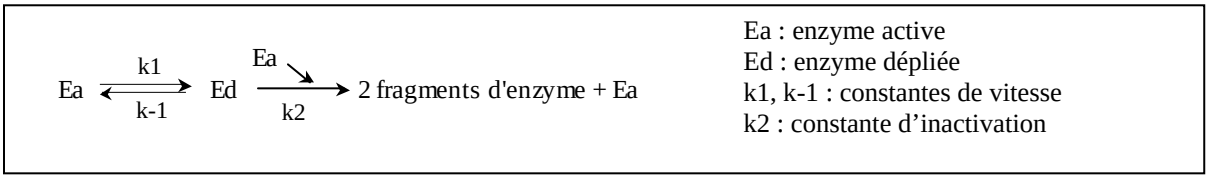
Mar Yust *et al.* (2004) ont montré que certains hydrolysats de protéines de colza obtenus avec l'Alcalase inhibent la pepsine. Plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence d'une inhibition compétitive de l'enzyme par certains petits peptides continuellement produits au cours de l'hydrolyse (Boudrant et Cheftel, 1976 ; Sousa *et al.*, 2004 ; Perea et Uglade, 1996). Les cinétiques d'hydrolyse de protéines de lait, de maïs ou de blé par l'Alcalase ou la Neutrase ont déjà été modélisées avec succès par l'équation de Michaelis-Menten présentant une inhibition compétitive par les produits d'hydrolyse (Kammoun *et al.*, 2001 ; Sousa *et al.*, 2004 ; Hardwick et Glatz, 1989).

D'autres types d'inhibition ont été observés. Par exemple, Kammoun *et al.* (2003) ont mis en évidence une inhibition compétitive-incompétitive de la Neutrase lors de l'hydrolyse de protéines de blé. Leurs travaux ont montré que les peptides finaux de faible taille moléculaire (< 1000 Da) sont ceux qui participent le plus à ce phénomène d'inhibition.

** Autolyse de l'enzyme.*

L'autolyse de l'enzyme est un phénomène souvent mis en évidence dans la protéolyse enzymatique (Margot *et al.*, 1996). De nombreux mécanismes d'autolyse ont été proposés (Sadana, 1986). Ceux-ci diffèrent selon le type de protéase et diffèrent même entre les protéases d'un même type (Chen *et al.*, 2003). La plupart des études ont tout de même été réalisées sur des protéases à sérine comme la chymotrypsine ou les subtilisines (Bódi *et al.*, 2001 ; Kunitz et Northrop, 1934, cité par Sadana, 1986 ; Stoner *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2003).

Le modèle d'autolyse le plus classiquement proposé s'appuie sur la description d'une protéase résistante à la protéolyse sous sa forme native tandis que, sous sa forme dépliée ou partiellement dépliée, cette dernière est susceptible d'être dégradée par une protéase native (Markert *et al.*, 2001). Il en résulte le schéma réactionnel suivant (Kunitz et Northrop, 1934 ; Stoner *et al.*, 2004) :



La première étape implique un équilibre entre l'état natif et l'état déplié de la protéase et la seconde étape décrit l'autolyse. La relation entre la population d'enzyme native et celle dénaturée est décrite par la constante d'équilibre $K_{dépliement}$ égale à la concentration d'enzyme native divisée par la concentration d'enzyme dépliée. $K_{dépliement}$ est lié à l'énergie libre de dépliement de la protéase, $\Delta G_{dépliement}$, par l'équation suivante :

$\Delta G_{dépliement}$, = –R.T.ln $K_{dépliement}$, où R est la constante des gaz parfaits et T est la température absolue (Stoner *et al.*, 2004). La vitesse d'autolyse est fonction de la stabilité thermodynamique de la protéase et de son efficacité catalytique. Ainsi, la vitesse d'autolyse augmente avec la température (Chen *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 1996). De plus, le phénomène d'autolyse est favorisé à des concentrations d'enzyme élevées ou à des ratios Eo/So élevés (Diniz et Martin, 1996).

Le mécanisme précédent peut être plus complexe lié à la présence d'autres phénomènes. En effet, Boudrant et Cheftel (1976) ont souligné le rôle protecteur du substrat à l'encontre de l'autolyse de l'enzyme ; González-Tello *et al.* (1994a) et Moreno et Cuadrado (1993) ont supposé que l'enzyme s'autolyse lorsque cette dernière est complexée avec le substrat ; Chen *et al.* (2003) ont montré que certains fragments polypeptidiques issus de l'autolyse de la protéase sont toujours actifs ; enfin, Yang *et al.* (1996) et Kawamura *et al.* (1981) ont utilisé un schéma réactionnel comprenant des effets d'autolyse et de dénaturation thermique de l'enzyme :

$$E \underset{}{\overset{Ko}{\rightleftharpoons}} E1 \xrightarrow{k1} Ed$$

$$E + E1 \overset{Kp}{\rightleftharpoons} EE1 \xrightarrow{kd} E + \text{fragments d'enzyme}$$

E : enzyme sous la forme native
E1 : enzyme réversiblement dénaturée partiellement inactive
Ed : enzyme irréversiblement dénaturée et complètement inactive
k1 : constante de vitesse de dénaturation
kd : constante de vitesse de digestion
Ko et Kp : constantes d'équilibre

** Dénaturation thermique, chimique ou mécanique de l'enzyme.*

Les protéases sont sensibles à la température, au pH et aux forces de cisaillement (Diniz et Martin, 1996 ; Ghadge *et al.*, 2003 ; Shi *et al.*, 2004). Ces paramètres sont connus pour modifier l'intégrité de la structure tertiaire de la protéase nécessaire à son activité. En effet, ces paramètres peuvent induire un dépliement réversible ou irréversible de l'enzyme, appelé dénaturation de l'enzyme, qui entraîne une perte de son activité biologique.

De nombreux mécanismes de dénaturation thermique ont été mis en évidence. Certains sont présentés dans le tableau B.III.7.

Tableau B.III.7 : quelques mécanismes de dénaturation thermique de protéases (Aymard et Belardi, 2000 ; Tardioli *et al.*, 2003 ; Ferreira *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 1996).

Mécanisme	**Schéma réactionnel**	**Equation**
« une étape – deux états »	$Ea \xrightarrow{k} Ed$	At / Ao = exp (–k . t)
« une étape – deux états » et activité résiduelle de l' enzyme	$Ea \xrightarrow{k} Ed$	At / Ao = (1 – α1) exp (–k . t) + α1
« en parallèle »	$Ea1 \xrightarrow{k1} Ed1$ $Ea2 \xrightarrow{k2} Ed2$	At / Ao = a . exp (–k1 . t) + (1 – a) . exp (–k1 . t)
« en série » (avec réversibilité)	$Ea \underset{k-1}{\overset{k1}{\rightleftarrows}} Ed1 \xrightarrow{k2} Ed2$	At / Ao = D1 . exp (–α . t) + D2 . exp (–β . t)
« en série » (avec irréversibilité)	$Ea \xrightarrow{k1} Ed1 \xrightarrow{k2} Ed2$	At / Ao = D1 . exp (–k1 . t) + D2 . exp (–β . t) + D3

Ea : enzyme active ; Ed : enzyme dénaturée ; k, k1, k2 : constantes de vitesse ; At : activité enzymatique au temps t ; Ao : activité enzymatique initiale ; a : proportion en enzyme Ea1 ; α1 : niveau d'activité de l'enzyme à long terme ; α et β : constantes de vitesse apparentes ; D1, D2, D3 : constantes paramétriques.

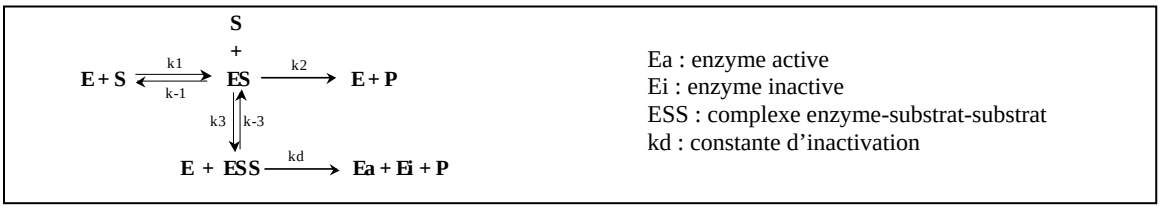
En particulier, il est montré (Aymard et Belardi, 2000) :

- le processus dit « une étape – deux états » où l'enzyme sous forme native et active se dénature et devient inactive. Ce processus, qui est décrit par une réaction irréversible unimoléculaire de premier ordre, est le plus utilisé pour décrire l'inactivation thermique des enzymes. Dans certains cas, l'enzyme dénaturée se retrouve dans un état stable et garde une activité résiduelle (Tardioli *et al.*, 2003).
- le processus dit « d'inactivation en parallèle » où la préparation enzymatique est constituée de plusieurs isoenzymes actives qui diffèrent par leur sensibilité à la chaleur.
- le processus dit « en série » où l'enzyme se dénature après plusieurs réactions de premier ordre. Dans ce modèle, la réversibilité des réactions (sauf la dernière) peut être considérée et l'enzyme peut garder une activité partielle sous ses états intermédiaires ou même sous son état final. Par exemple, Ferreira *et al.* (2003) ont simulé la perte d'activité de l'Alcalase à 60 °C en supposant que la perte d'activité entre les différents états est irréversible.

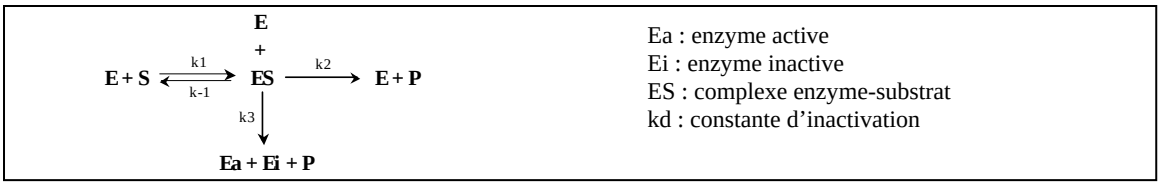
** Quelques schémas réactionnels mis en évidence.*

En règle générale, la diminution de la vitesse d'hydrolyse résulte non pas de l'action d'un des phénomènes énumérés précédemment mais plutôt de la combinaison de plusieurs phénomènes. Il en résulte des schémas réactionnels plus complexes comme ceux de :

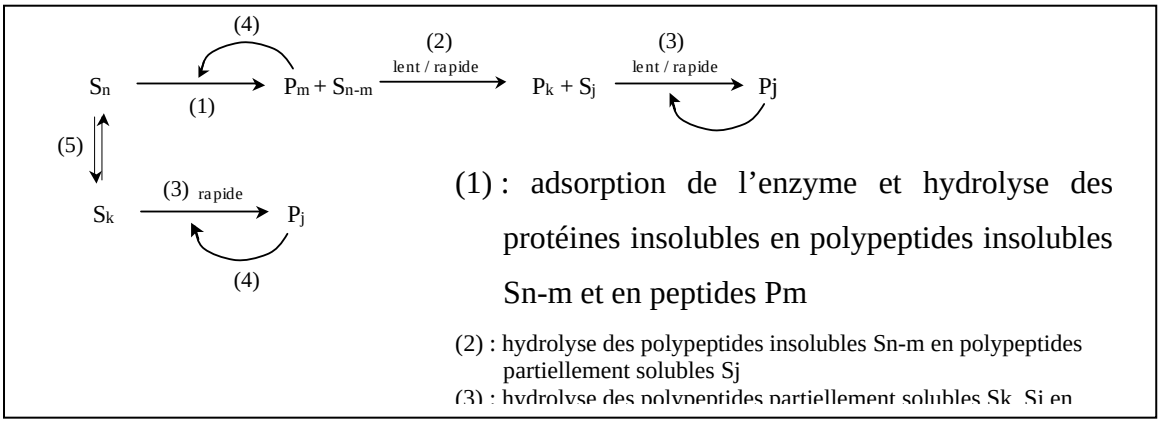
- Moreno et Cuadrado (1993) qui ont mis en évidence, lors de l'hydrolyse de protéines de pois chiche par l'Alcalase, une inhibition par le substrat et une autolyse de l'enzyme liée au phénomène d'inhibition :



- Márquez et Vásquez (1999) qui ont mis en évidence, lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine par l'Alcalase, une autolyse de l'enzyme lorsque celle-ci est sous la forme complexée ES :



- Constantinides et Adu-Amankwa (1980) qui ont mis en évidence, lors de l'hydrolyse de protéines de soja avec une protéase de *Penicillium duponti*, un schéma réactionnel comprenant des étapes de catalyse, d'adsorption enzyme-substrat et d'inhibition compétitive de l'enzyme.



- González-Tello *et al.* (1994a) ont proposé un modèle où l'enzyme subit une inactivation du second ordre et une inhibition par un inhibiteur non protéique initialement présent dans le substrat.

III.3. CARACTERISATION DES PEPTIDES.

Les hydrolysats de protéines d'origine animale ou végétale sont des mélanges particulièrement complexes constitués de protéines, de peptides, d'acides aminés, de minéraux et d'autres composés non azotés tels que les sucres, les lipides, les composés antinutritionnels. L'adéquation de ces hydrolysats à un besoin fonctionnel, nutritionnel, nutraceutique ou pharmacologique requiert au préalable un fractionnement sélectif des peptides d'intérêt. Cette étape de fractionnement peut être réalisée par des procédés membranaires et/ou chromatographiques (Jang et Lee, 2004). Les méthodes de séparation impliquées dans de telles techniques sont basées sur des phénomènes physico-chimiques tels que la solubilité (solubilisation sélective), la polarité (chromatographie d'adsorption), l'affinité (chromatographie d'affinité), la taille (chromatographie d'exclusion de taille, ultrafiltration), l'hydrophobie de surface (chromatographie en phase inverse), la charge électrique (chromatographie d'échange d'ions), la combinaison de la charge électrique et de la taille (électrophorèse de zone sur support, nanofiltration).

Après la séparation des peptides d'intérêt, la caractérisation de ces fractions par des méthodes d'identification chromatographiques et/ou électrophorétiques permet souvent d'en favoriser la valorisation.

III.3.1. Les techniques chromatographiques.

La chromatographie est une technique qui permet de séparer les différentes molécules d'un mélange. Elle est caractérisée par deux phases distinctes :

- une phase stationnaire, généralement placée dans une colonne, sur laquelle les constituants du mélange sont retenus avec plus ou moins d'affinité,
- et une phase mobile (liquide ou gazeuse) dans laquelle les constituants du mélange sont miscibles et transportés à travers la phase stationnaire.

Ainsi, les molécules du mélange sont plus ou moins retardées suivant leur affinité par rapport à la phase stationnaire.

Les peptides se différencient les uns des autres principalement par leur taille moléculaire, leur charge à un pH donné et leur caractère hydrophile/hydrophobe. En conséquence, ce sont des molécules qui se prêtent bien à l'analyse par chromatographie d'exclusion de taille (séparation selon leur taille), par chromatographie d'échanges d'ions (séparation selon leur charge) ou par chromatographie en phase inverse (séparation selon leur degré d'hydrophobie).

La chromatographie est considérée comme étant la méthode de choix aussi bien pour l'analyse de la composition en peptides des hydrolysats protéiques que pour la purification des peptides d'intérêt (Silvestre, 1997). De plus, suivant la résolution des techniques employées et la pureté du produit désiré, il est souvent envisagé la combinaison de plusieurs techniques chromatographiques.

Le type de détection des constituants fractionnés est déterminant pour leur caractérisation. Les plus couramment utilisés sont la spectrométrie UV ou visible, la fluorimétrie, la réfractométrie et la spectrométrie de masse (Godon, 1996).

III.3.1.1. Chromatographie haute performance en phase inverse (CLHP-PI).

Dans cette technique chromatographique, la séparation est fonction des interactions hydrophobes entre les molécules biologiques et les ligands fixés sur le support chromatographique. Les supports sont généralement à base de silice ou de résine désactivée. Les molécules greffées sur le support, principalement des chaînes hydrocarbonées de 2 à 18 atomes de carbone, sont apolaires tandis que la phase mobile est polaire. Un gradient de concentration croissante en solvant organique, comme l'acétonitrile ou le 2-propanol par exemple, est nécessaire pour l'élution.

- ***Séparation par CLHP-PI.***

La CLHP-PI est la technique chromatographique la plus universellement utilisée pour caractériser les hydrolysats protéiques ou pour contrôler la production des peptides au cours de l'hydrolyse (Hühmer *et al.*, 1997 ; Silvestre, 1997). Elle permet de caractériser le caractère hydrophile/hydrophobe des peptides. Plusieurs travaux ont permis d'établir une relation entre le temps de rétention des peptides en CLHP-PI et le degré d'hydrophobie des peptides séparés. Pour cela, la calibration de la colonne est réalisée à partir de peptides standard dont l'indice d'hydrophobie est connu. Cet indice d'hydrophobie est obtenu par l'addition des valeurs individuelles d'hydrophobie des acides aminés les constituant, préalablement déterminées par une méthode de régression répétitive (Van der Ven *et al.*, 2001 ; Schweizer, 2002). Cependant, selon la méthode empirique de détermination des valeurs d'hydrophobie des acides aminés et les conditions de séparation (type de colonne, conditions opératoires), des différences notables sont observées entre les études.

De nombreux travaux portent sur la séparation par CLHP-PI de peptides bioactifs présents dans des hydrolysats protéiques (Zhao *et al.*, 1997). Nous citerons, par exemple, la séparation de peptides amers à partir d'hydrolysats de protéines de lait ou de peptides anti-ACE à partir de protéines animales ou végétales (Jang et Lee, 2004 ; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000 ; Marczak *et al.*, 2003).

- ***Couplage CLHP-PI et spectrométrie de masse (SM).***

La large utilisation de la CLHP-PI est favorisée par la possibilité de coupler cette technique avec la spectrométrie de masse. En effet, la phase mobile utilisée en CLHP-PI (mélange eau/acétonitrile) est compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse. De nombreux travaux ont ainsi porté sur l'analyse d'hydrolysats protéiques par ce couplage (Froidevaux *et al.*, 2000 ; Léonil *et al.*, 2000 ; Schweizer, 2002). Si la séparation est très sélective, chaque pic du chromatogramme correspond à une seule molécule dont la masse est déterminée par spectrométrie de masse. Ce couplage constitue, ainsi, un puissant outil de caractérisation des hydrolysats protéiques. Il permet, notamment, de constituer la carte peptidique des hydrolysats. Par exemple, Doucet *et al.* (2003) ont identifié par CLHP-PI couplé à la SM 130 peptides après hydrolyse intensive de protéines de lait avec l'Alcalase. Ce travail facilite l'identification des peptides bioactifs comme, par exemple, celle de peptides opioïdes à partir de protéines de lait (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000) ou celle de peptides antioxydants à partir de protéines végétales (Chen *et al.*, 1995). Les cartes peptidiques permettent également de déterminer la spécificité des protéases (Yeboah *et al.*, 1999) ou de localiser les modifications chimiques de la structure primaire des peptides (Léonil *et al.*, 2000).

Cependant, malgré sa haute capacité résolutive, la CLHP-PI n'est pas toujours la méthode retenue pour caractériser les hydrolysats ; en effet, la chromatographie d'exclusion de taille est également une méthode chromatographique très souvent utilisée pour caractériser la distribution de taille moléculaire des peptides, en particulier si les hydrolysats sont destinés à des applications nutritionnelles (Silvestre, 1997).

III.3.1.2. Chromatographie haute performance d'exclusion de taille (CLHP-ET).

La CLHP-ET (également appelée perméation de gel ou filtration sur gel) est basée sur les différentes possibilités des molécules, selon leur volume hydrodynamique (taille et

conformation moléculaires), à pénétrer dans le réseau de la phase stationnaire. Les très grosses molécules ne pénètrent pas dans le réseau, traversant rapidement la colonne chromatographique, tandis que les autres molécules migrent à travers le gel d'autant plus profondément que leur taille est petite, traversant ainsi la colonne avec une vitesse inversement proportionnelle à leur taille. Cette technique permet donc de déterminer la distribution de taille moléculaire des peptides présents dans les hydrolysats.

La CLHP-ET est une technique très utilisée aussi bien à l'échelle analytique que préparative. Elle est connue pour posséder une bonne reproductibilité, une assez bonne résolution de séparation, une grande robustesse et, en général, de bons rendements (Guérard *et al.*, 2001). Les premiers gels souples composés de dextrane, d'agarose ou de polyacrylamide ont récemment été remplacés par des gels solides plus stables au regard des pH extrêmes, des fortes concentrations en sels ou des solvants organiques, et plus performants en terme de résolution et de temps de séparation. Ces derniers sont, par exemple, composés de silice greffée avec des composés hydrophiles (gel de type TSK) (Zhao *et al.*, 1997 ; Smyth et FitzGerald, 1997) ou d'un mélange d'agarose ou de dextrane réticulé (gel de type Superdex Peptide®) (Guerard *et al.*, 2002 ; Tossavainen *et al.*, 1997 ; Smyth et FitzGerald, 1997 ; Gilmartin et Jervis, 2002). Cependant, malgré les efforts des fabricants afin de rendre les gels inertes par rapport aux polymères biologiques, certains travaux ont montré qu'il existe des interactions secondaires de type électrostatique ou hydrophobe entre les biomolécules et la phase stationnaire entraînant alors une rétention non-idéale (Smyth et FitzGerald, 1997).

Enfin, certains travaux ont montré une corrélation entre la distribution de taille moléculaire obtenue par CLHP-ET et le profil chromatographique obtenu par CLHP-PI (Van der Ven *et al.*, 2001).
Aujourd'hui, le couplage CLHP-ET et spectrométrie de masse est en développement afin de caractériser plus précisément la distribution de taille moléculaire des peptides (Léonil *et al.*, 2000).

III.3.1.3. Chromatographie haute performance d'échange d'ions (CLHP-EI).

La CLHP-EI permet de séparer les peptides selon leur charge. Selon la charge du support, le fractionnement peut être réalisé sous deux formes. Si le support est chargé négativement, les peptides retenus sont basiques (chargés positivement) ; il s'agit alors de la chromatographie

échangeuse de cations. Inversement, si le support est chargé positivement, les peptides retenus sont acides ; il s'agit de la chromatographie échangeuse d'anions.

Dans ce type de chromatographie, le pH et la force ionique de la phase mobile jouent un rôle primordial puisque ces deux paramètres influencent directement l'intensité des charges des peptides et du support. La séparation présente généralement une meilleure résolution en échange de cations qu'en échange d'anions (Bouhallab *et al.*, 1996).

III.3.2. Les techniques électrophorétiques.

III.3.2.1. L'électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).

Dans cette technique, les molécules protéiques sont mises en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), qui, par ses charges négatives, masque les charges propres des peptides. Selon la charge globale de l'ensemble peptide/SDS, la vitesse de migration des peptides dans un réseau de polyacrylamide sous l'action d'un champ électrique, dépend uniquement de la longueur de la chaîne peptidique (Laemmli, 1970).

La technique du SDS-PAGE est quelque fois utilisée pour caractériser les mélanges peptidiques comme cela a été réalisé par Masson *et al.* (1986) avec un hydrolysat de protéines de blé par la pepsine. Elle présente toutefois le désavantage de ne pas être adaptée pour la séparation des peptides inférieurs à environ 2500 Da.

III.3.2.2. L'électrophorèse capillaire (EC).

L'EC est aujourd'hui une technique de séparation intermédiaire entre l'électrophorèse classique et la chromatographie liquide. Elle permet de séparer aussi bien les biomolécules pour lesquelles la CLHP est peu performante que de quantifier les petites molécules non analysables par l'électrophorèse sur gel (Rouessac et Rouessac, 1996). Très sensible, elle permet une séparation très rapide et très résolutive pour les molécules chargées (Trivin et Le Bricon, 2003).

Cette méthode analytique est basée sur les différences de mobilité des molécules chargées en solution. Leur séparation se fait dans un fin capillaire empli d'une solution tampon, sous l'action d'un champ électrique. L'EC s'applique aussi bien pour les molécules biologiques de faible masse molaire telles que les acides aminés, les peptides et les nucléotides, que pour les biomolécules de haute masse molaire telles que les protéines ou les polynucléotides.

Plusieurs modèles ont été établis pour prédire la mobilité électrophorétique de petits peptides suivant leur composition en acides aminés. Tessier *et al.* (2004) ont mis en place une méthodologie permettant de prédire la composition en acides aminés des peptides en fonction de leur mobilité électrophorétique et de leur taille moléculaire. Cette prédiction nécessite le couplage EC et spectrométrie de masse.

En règle générale, une bonne séparation des peptides d'intérêt ne peut être obtenue qu'avec une unique technique chromatographique ou électrophorétique. C'est pourquoi, ces techniques sont souvent combinées. La combinaison la plus largement retrouvée est celle de la CLHP-ET suivie de la CLHP-PI mais l'électrophorèse capillaire est aussi une technique souvent combinée (Strömqvist, 1994 ; Opiteck et Jorgenson, 1997). Enfin, afin de faciliter la séparation chromatographique, les hydrolysats sont souvent pré-fractionnés par des procédés membranaires (Jang et Lee, 2004).

I. PREPARATION DES SUBSTRATS PROTEIQUES.

I.1. LE TOURTEAU DE COLZA.

Le tourteau de colza utilisé dans cette étude provient de l'industrie huilière et a été fourni par Robbe-Novance (Compiègne, France). Ce tourteau est issu d'une variété de colza 00 caractérisée par une faible teneur en glucosinolates et acide érucique. Afin d'éliminer tous les gros débris présents dans le tourteau tels les téguments et la paille, le tourteau a été tamisé pour obtenir une farine de granulométrie inférieure à 1 mm et plus homogène en taille de particule.

Matériel : tamis (Osi Afnor NFX 11504).

I.2. PROTOCOLES POUR LA PREPARATION D'ISOLATS PROTEIQUES.

I.2.1. Procédés préliminaires.

- ***Procédé n° 1 : extraction et précipitation isoélectrique.***

50 g de farine et 1 L d'une solution de soude 0,1 N sont placés dans une fiole d'Erlenmeyer (pH du mélange = 12,4). Le mélange est alors agité à température ambiante pendant 1 h sur une table d'agitation (agitation orbitale) à 200 tr/mn. Une séparation solide-liquide est effectuée par centrifugation du mélange à 4000 g pendant 10 mn à 20 °C. Le surnageant contient la fraction de protéines solubles et est appelé, par la suite, « extrait protéique ». Le culot, appelé dans ce travail « farine résiduelle », est écarté. Les protéines présentes dans l'extrait protéique sont précipitées en abaissant le pH au point isoélectrique de ces dernières, pH 4,5 (d'après les travaux de Schweizer, 2002 réalisés au sein du laboratoire), avec une solution d'HCl 3 N ou 1 N. Après centrifugation à 4000 g pendant 10 mn à 20 °C, le culot, essentiellement composé des protéines précipitées, est récupéré tandis que le surnageant (résiduel) est écarté. Ce culot protéique est appelé, par la suite, le « précipité isoélectrique ».

- ***Procédé n° 2 : « dépolyphénolysation », extraction et précipitation isoélectrique.***

Suivant le procédé de Lacroix *et al.* (1988), à 50 g de farine, placés dans un pot de centrifugation de 350 mL, sont ajoutés 200 mL d'un mélange méthanol/acétone/eau de ratio volumique 7/7/6. Le mélange est homogénéisé avec un appareil ultraturax à 8200 trs/mn pendant 5 mn à température ambiante. Après centrifugation à 2000 g pendant 5 mn, l'extrait soluble est écarté et la farine restante est retraitée suivant le même protocole. Cette opération

est répétée 7 fois. L'extrait combiné méthanol/acétone/eau est appelé par la suite l' « extrait polyphénol ». La farine restante, appelée « farine dépolyphénolée », est séchée sous une hôte ventilée à température ambiante pendant 2 jours. La farine dépolyphénolée est alors extraite suivant le même protocole que le procédé n° 1. De même, les protéines de l'extrait protéique sont isolées suivant le même protocole que le procédé n° 1 conduisant à la production d'un précipité isoélectrique.

- ***Procédé n° 3 : extraction et dialyse.***

Dans ce procédé, la farine est extraite de la même manière que dans le procédé n° 1 à l'exception du type d'agitation où une agitation magnétique à 600 tr/mn à été effectuée. L'extrait protéique est alors concentré environ 5 fois par élimination de l'eau à l'aide d'un évaporateur rotatif (55 °C, 72 mbars). L'extrait protéique concentré est placé dans un sac de dialyse en cellulose dont la taille des pores est calibrée à 12 kDa. Le sac de dialyse a été préalablement préparé suivant les indications du fabricant : lavage 3 h à l'eau suivi d'un lavage avec une solution de sulfate de sodium à 0,3 % (p/v) à 80 °C pendant 1 mn puis d'un rinçage avec de l'eau à 60 °C pendant 2 mn, suivi d'une acidification avec une solution d'acide sulfurique à 0,2 % (p/v) et d'un rinçage avec de l'eau à 60 °C. La dialyse est alors effectuée avec un rapport volumique de matière à dialyser/eau de 1/200, en milieu clos agité pendant 48 h à 5 °C. L'eau osmosée est changée une fois après 24 h de dialyse.

- ***Procédé n° 4 : extraction, précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse.***

Comme réalisé par Chen et Rohani (1992), ce procédé consiste à ajouter du sulfate d'ammonium dans un extrait protéique concentré (qui a été préparé selon le procédé n° 3) de telle sorte à avoir une concentration finale en sulfate d'ammonium de 55 % (p/v). Le mélange est agité pendant 30 mn à pH 4,5 et à température ambiante afin d'obtenir, d'après Tessier *et al.* (1992), un rendement de précipitation optimal. Le mélange est alors centrifugé à 5000 g pendant 10 mn. Le culot est récupéré et solubilisé dans de l'eau osmosée au ratio 1/10 (p/v). Afin d'éliminer les sels, le mélange est alors dialysé dans les mêmes conditions opératoires que celles présentées dans le procédé n° 3.

Réactifs : acide chlorhydrique (Carlo Erba, 403872), sulfate de sodium (Prolabo, 28126515), hydroxyde de sodium (Merk, B575798 003), sulfate d'ammonium (Sigma, 51K0098), acide nitrique (Prolabo, 92113).

Matériel : sac de dialyse (Sigma, 10B040655), homogénéisateur (ultraturax T25 Janke et Kunkel, Ika-Labortechnik), pH-mètre (PHM 62 Standard, Radiometer), évaporateur rotatif (R14.11, Büchi), centrifugeuse (Beckman J2-21M/E), agitateur magnétique (Jenway 1000).

I.2.2. Amélioration du procédé n° 2 pour l'obtention d'isolats protéiques.

Afin d'améliorer le procédé n° 2, les paramètres opératoires suivants sont étudiés.

- ***Ratio volumique éthanol/eau pour la dépolyphénolisation de la farine.***

Les ratios volumiques éthanol/eau choisis sont 2/1, 1/1 et 1/2. Le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude sont similaires à ceux utilisés dans le procédé n° 2 à l'exception du fait que la farine n'est extraite qu'une fois. Une fois le ratio du mélange éthanol/eau choisi, la farine est extraite 4 fois avec ce dernier.

- ***Ratio farine/solution de soude.***

La farine dépolyphénolée ou la farine non traitée sont extraites comme dans le procédé n° 2 à 25, 50 ou 100 g/L de soude. Notons que la farine dépolyphénolée ne possède pas une teneur en matière sèche comparable à celle de la farine non-traitée ; c'est pourquoi, l'extraction est effectuée sur la base de la masse de la farine non-traitée initialement prise.

- ***Point isoélectrique des protéines extraites.***

Afin de s'assurer que l'étape de dépolyphénolysation de la farine ne modifie pas le point isoélectrique des protéines extraites, des aliquots (20 mL) d'un extrait protéique issu d'une farine dépolyphénolée (extraction à 50 g/L) ont été ajustés avec de l'acide chlorhydrique à différentes valeurs de pH comprises entre 1,5 et 9 (variation de 0,5 en 0,5 unité). Chaque aliquot est ensuite centrifugé à 4000 g pendant 10 mn. La solubilité protéique à un pH donné est définie comme étant le rapport entre la masse de protéines restées solubles après centrifugation et la masse de protéines restées solubles à pH 12,4 après centrifugation.

- ***Dialyse des précipités isoélectriques.***

Les précipités isoélectriques sont mis en suspension dans de l'eau osmosée (ratio 1/3, p/v). La suspension est placée dans des sacs de dialyse en cellulose (« diamètre des pores » = 12 kDa) pour être dialysé sous agitation à 5 °C pendant 48h, contre de l'eau osmosée (ratio 1/100, v/v). L'eau est renouvelée une fois après 24 h.

- ***Récupération des protéines présentes dans les fractions résiduelles.***

* *Extractions supplémentaires de la farine résiduelle.*

La farine résiduelle obtenue après l'extraction d'une farine dépolyphénolée avec de la soude 0,1 N au ratio 25 g/L, est re-extraite dans les mêmes conditions opératoires que la première extraction. La nouvelle farine résiduelle est alors de nouveau extraite.

Une farine résiduelle obtenue dans les mêmes conditions que précédemment, est aussi extraite avec une solution de chlorure de sodium à 5 % de telle sorte à avoir un ratio masse sèche de farine résiduelle (g) sur volume de solution saline égal à 55. Ce type de solvant n'est pas arbitraire puisqu'il a déjà été utilisé avec succès par Kroll *et al.* (1991).

** Récupération des protéines présentes dans les surnageants résiduels.*

Les surnageants résiduels sont concentrés environ 10 fois par élimination de l'eau à l'aide d'un extracteur rotatif à vapeur (55 °C, 72 mbars) puis, après les avoir placés dans des sacs de dialyse en cellulose (diamètre des pores = 12 kDa), ils sont dialysés sous agitation à 5 °C contre de l'eau osmosée (ratio 1/100, v/v) pendant 48 h. Après 24 h, l'eau est renouvelée une fois.

Réactifs : acide chlorhydrique (Carlo Erba, 403872), hydroxyde de sodium (Merk (B575798 003).

Matériel : sac de dialyse (Sigma, 10B040655), hogénéiseur (ultraturax T25 Janke et Kunkel, Ika-Labortechnik), pH-mètre (PHM 62 Standar, Radiometer), évaporateur rotatif (R14.11, Büchi), centrifugeuse (Beckman J2-21M/E), agitateur magnétique (Jenway 1000).

I.2.3. Préparation des isolats en grande quantité.

Les isolats ont été préparés en deux fois. Chaque production a été effectuée à partir de 4,5 kg de farine. 60 g de farine sont placés dans 6 pots de centrifugeuse Beckman de 350 mL dans lesquels sont ajoutés 240 mL d'un mélange éthanol/eau (2/1, v/v). Le mélange de chaque pot est alors homogénéisé à 8200 trs/mn pendant 5 mn à l'aide d'un Ultraturax. Puis, après centrifugation à 2000 g pendant 5 mn, l' « extrait polyphénol » est écarté et les farines de chaque pot sont extraites à nouveau selon le même protocole. L'extraction est effectuée 4 fois en tout. L'ensemble de ces opérations est réalisée 13 fois. La totalité de la farine dépolyphénolée est placée dans un fût en plastique de 150 L avec 90 L de soude 0,1 N. Le mélange est agité mécaniquement à 2000 tr/mn pendant 1h puis centrifugé à 4000 g pendant 10 mn (6 × 300 mL par centrifugation, environ 60 centrifugations). L'extrait protéique est récupéré et ajusté à pH 4,5 avec de l'HCl 10 N pendant 30 mn. Après centrifugation à 4000 g pendant 10 mn (6 × 300 mL par centrifugation, environ 45 centrifugations), le précipité isoélectrique et le surnageant sont récupérés. Le précipité isoélectrique, resuspendu dans 3 volumes d'eau, est placé dans plusieurs sacs de dialyse dont la « taille des pores » est de 12 kDa (contenance d'environ 500 mL chacun). Les sacs de dialyse sont alors placés dans des fûts contenant 250 L d'eau osmosée, dans une chambre froide à 5 °C pendant 48 h de telle

sorte à avoir un ratio suspension/eau de 1/50 (v/v). L'eau est renouvelée après 24 h. (Les sacs de dialyse ont été utilisés plusieurs fois (3 – 4 fois) mais lavés entre chaque utilisation).

Le surnageant est, quant à lui, concentré environ 10 fois en évaporant l'eau à l'aide d'un évaporateur d'échelle pilote puis dialysé contre de l'eau osmosée dans les mêmes conditions que le précipité isoélectrique.

Enfin, les dialysats sont congelés à – 80 °C puis lyophilisés.

Réactifs : acide chlorhydrique (Carlo Erba, 403872), hydroxyde de sodium (Merk (B575798 003).

Matériel : sac de dialyse (Sigma, 10B040655), homogénéisateur (ultraturax T25 Janke et Kunkel, Ika-Labortechnik), pH-mètre (PHM 62 Standard, Radiometer), centrifugeuse (Beckman J2-21M/E).

I.3. PURETE PROTEIQUE ET RENDEMENT PROTEIQUE.

Les différents procédés sont comparés, étape par étape, suivant deux critères ; la pureté protéique qui permet de caractériser le degré de pureté en protéine de la fraction considérée et le rendement protéique qui permet de caractériser l'efficacité de récupération des protéines lors de l'étape considérée. Ces deux critères sont calculés d'après les formules suivantes :

$$\text{Pureté protéique (\%)} = \frac{\text{Masse de protéines dans la fraction (g)}}{\text{Masse sèche de la fraction (g)}} \times 100$$

$$\text{Rendement protéique global (\%)} = \frac{\text{Masse de protéines dans la fraction (g)}}{\text{Masse de protéines initialement présentes dans la farine (g)}} \times 100$$

$$\text{Rendement protéique de l'étape (\%)} = \frac{\text{Masse de protéines dans la fraction (g)}}{\text{Masse de protéines présentes dans la fraction précédente (g)}} \times 100$$

II. HYDROLYSE ENZYMATIQUE.

II.1. PROTEASES SELECTIONNEES.

Les caractéristiques des protéases sélectionnées sont présentées dans le tableau M.II.1.

Tableau M.II.1 : caractéristiques majeures des protéases sélectionnées au cours de cette étude.

PROTEASE (producteur) *organisme ou microorganisme producteur* lot	**pHo et To (°C)**	**Particularités**
ALCALASE 2,4L (Novozymes) *Bacillus licheniformis* Sigma 013K1382 et 110K1352	6,5 <pHo< 8,5 55 <To< 70	Protéase à sérine (endoprotéase) Subtilisine Carlsberg (TM = 27300 g/mol) Faible spécificité Activité protéolytique : 2,4 UA/g Inhibiteurs : DFP, PMSF Formulation liquide, densité : 1,16 g/mL Germes totaux : < 5×10^4 cellules/g Inactivation 20 mn à 85 °C ou 10 mn à 90 °C
NEUTRASE 0,8L (Novozymes) *Bacillus subtillis* Sigma 031K1351	5,5 <pHo< 7,5 45 <To< 55	Métalloprotéase à Zn^{2+} (endoprotéase), uniquement protéase neutre Faible spécificité Activité protéolytique : 0,8 UA/g Inhibiteur : EDTA ; Stabilisateur : Ca^{2+} Formulation liquide, densité : 1,25 g/mL Germes totaux : < 5×10^4 et < 10^4 cellules/g Inactivation : 2 mn à 85 °C
PROLYVE BS (Lyven) *Bacillus subtillis* Lyven EC 2Y01192	6,5 <pHo< 7,5 45 <To< 55	Métalloprotéase à Zn^{2+} (endoprotéase) Protéase neutre (+ protéases alcalines) Faible spécificité Activité protéolytique : ≈ 0,5 UA/g Inhibiteur : EDTA, dithiozone ; Stabilisateur : Ca^{2+} Formulation solide Inactivation : 10 mn à 85 °C
LYPAINE 6500 (Lyven) *Carica papaya* Lyven EC 2LI2151	7 <pHo< 8 65 <To< 75	Protéase à cystéine (endoprotéase), Papaïne (TM = 23000 g/mol) Spécificité étroite (préférentiellement : -Leu, -Phe, -Tyr, -Ala) Inhibiteur : Cu^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} ; Activateur : EDTA, Cystéine Formulation liquide (40 % de sorbitol)
ORIENTASE 90N (Quest International) *Bacillus subtillis* Quest International	pHo= 6 To ≤ 55 °C	Protéase à sérine (endoprotéase), Subtilisine Faible spécificité Activité protéolytique : ≈ 0,05 UA/g Formulation solide Inactivation : 10 mn à 85 °C
ESPERASE 7,5L (Novozymes) *Bacillus lentus* Novozyme	7,5 <pHo< 10 55 <To< 75	Protéase à sérine (endoprotéase), Subtilisine, protéase alcaline Faible spécificité Activité protéolytique : 7,5 KNPU/g ≈ 2,2 UA/g Formulation liquide, densité : 1,1 g/mL Germes totaux : < 5×10^4 cellules/g Inactivation : 10 mn à 90 °C (6 < pH < 8)
PRONASE SG (Sigma) *Streptomyces griseus* Sigma 102K0925 et 111K1134	pHo = 8,8 To = 37 °C*	Protéase à sérine (endoprotéase) Protéase neutre (monomère de 20000 g/mol) Purifiée (par chromatographie) : une des protéases de la Pronase* Spécificité étroite (clive préférentiellement en C-terminal des acides aspartique et glutamique)* Formulation solide Non spécifiée grade alimentaire

pHo : pH optimal ; To : température optimale en °C ; TM : poids molaire ; DFP : diisopropyl fluorophosphate ; PMSF : Fluorure de phényl méthanesulfanyl ; EDTA : acide éthylène diamine trétraacétique ; UA : Unité Anson ; KNPU : Kilo Novo Protease Unit ; * : d'après Yoshida *et al.* (1988).

II.2. ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES ENZYMES.

II.2.1. Activité protéolytique totale à pH 7,5 et 40 °C suivant la méthode de Anson.

L'activité protéolytique totale des enzymes est déterminée à pH 7,5 et 40 °C suivant la méthode de Anson modifiée (Novozymes, 1979). Par cette méthode, l'hémoglobine dénaturée est incubée avec l'enzyme sous des conditions contraintes (10 mn, pH 7,5 et 40 °C). L'hémoglobine non digérée est précipitée par ajout d'acide trichloroacétique (TCA). La quantité d'azote non protéique soluble dans le TCA est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, qui, en réagissant avec certains acides aminés (tyrosine, tryptophane, cystéine et histidine) donne une couleur bleue.

Dans deux tubes à essais de 10 mL est ajouté 0,5 mL de la solution de protéase (diluée à la concentration souhaitée dans un tampon phosphate à 0,1 M). La solution d'hémoglobine préalablement préparée [6,35 g d'hémoglobine solubilisée dans une solution composée d'urée (115 g), de NaOH 1 N (24 g), de KH_2PO_4 1 M (56 g) et d'eau déminéralisée (qsp 326 g)] est ajustée à pH 7,5 avec de l'HCl 1 N et chauffée 40 mn à 40 °C. 2,5 mL de TCA 0,3 M sont ajoutés dans l'un des tubes afin de constituer la référence. L'hémoglobine dénaturée (1 mL) est placée dans les deux tubes qui sont alors incubés 10 mn à 40 °C dans un bain-marie. 2,5 mL de TCA sont alors ajoutés dans le tube échantillon et les deux tubes sont vortexés puis laissés 30 mn à température ambiante. Les tubes sont de nouveau vortexés et le mélange est filtré sur filtre seringue 0,22 µm. 1,5 mL du filtrat ou du blanc sont ajoutés dans 2,8 mL de NaOH 0,5 N. Puis 1 mL de réactif de Folin-Ciocalceu (2 N dilué 2 fois avec de l'eau osmosée) est ajouté dans chaque tube et le mélange vortexé est laissé 8 mn à température ambiante. L'absorbance est lue à 750 nm contre le blanc.

Comme cela a été observé par Novozymes (1979), l'absorbance à 750 nm en fonction de la quantité d'enzyme donne une courbe légèrement incurvée. Une unité Anson (UA) est alors définie comme étant la quantité d'enzyme (en g pour les préparations solides ou en mL pour les préparations liquides) pour avoir une absorbance de 0,1. Le nombre d'UA/g d'enzyme ou d'UA/mL d'enzyme est alors déduit. Le pourcentage d'erreur est inférieur à 14 %.

Réactifs : hémoglobine bovine (Sigma, 117H7604), réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma, 112K3645), acide trichloroactétique pur (Labosi, 2895229), NaOH (Merck, B575798 003), KH_2PO_4 (Merck, 9010549).

Matériel : bain marie (Bioblock, Polystat 33), spectrophotomètre UV/Visible (LKB Biochrom, Novaspec 4049), filtre seringue (Millex, Millipore), pH-mètre (Radiometer, PHM 62).

II.2.2. Modélisation de l'activité protéolytique en fonction du pH et de la température.

II.2.2.1. Valeurs expérimentales de l'activité protéolytique.

Le précipité isoélectrique est solubilisé 1,5 h dans un réacteur thermostaté et agité, à la température désirée (25 – 70 °C), à une concentration de 30 g/L et dans une solution tampon à 0,05 M différant selon le pH souhaité : soit une solution tampon de phosphate de potassium pour les pH compris entre 6 et 7,5, soit une solution tampon d'acide borique/borate pour les pH compris entre 8,5 et 10, soit une solution d'acide acétique/acétate pour un pH de 5.

Dans chacun de deux tubes de 6 mL est ajouté 0,25 mL de la solution de protéase (diluée à la concentration souhaitée dans de l'eau osmosée). 1,25 mL de TCA 0,3 M est ajouté dans l'un des tubes afin de constituer la référence. Pour un couple pH/température donné, le précipité isoélectrique (0,5 mL) est placé dans les deux tubes (d'où une concentration finale en protéines de 18,8 g/L dans le milieu réactionnel sans le TCA). Les tubes sont alors incubés 10 mn au pH et à la température désirés. Les tubes sont agités manuellement toutes les 3 mn lors de l'incubation. Après l'ajout de 1,25 mL de TCA dans le tube échantillon, les tubes sont vortexés puis laissés 30 mn à température ambiante. Le mélange est alors filtré sur filtre seringue 0,22 µm. Chaque filtrat (0,75 mL) est mélangé dans 1,4 mL de NaOH 0,5 N, puis 1 mL de réactif de Folin-Ciocalceu (1 N) est ajouté dans chaque tube. Les mélanges sont vortexés et laissés 8 mn à température ambiante. L'absorbance est alors lue à 750 nm contre le blanc.

Comme réalisé par Baek et Cadwallader (1995), chaque valeur d'absorbance est alors transformée, en une valeur de degré d'hydrolyse obtenu après 10 mn, appelé DH_{TCA}, dont la formule est la suivante :

$$DH_{TCA}\ (\%) = [(A - A_0) / (A_{max} - A_0)] \times 100$$

A_0 : Absorbance à 750 nm de la matière azotée soluble dans le TCA pour le substrat non hydrolysé (A_0 correspond au blanc).

A_{max} : Absorbance à 750 nm de la matière azotée soluble dans le TCA après dégradation complète du substrat. A_{max} est déterminée en hydrolysant 0,2 g de substrat avec 20 mL d'HCl 6 N à 110°C pendant 24 heures.

A : Absorbance à 750 nm de la matière azotée soluble dans le TCA après hydrolyse pendant 10 mn.

Pour chaque couple pH/température étudié, le DH_{TCA} est tracé en fonction du logarithme de la quantité d'enzyme. Comme montré par Baek et Cadwallader (1995), il est obtenu des droites. Une unité d'activité protéolytique, U_{TCA}, est alors définie comme étant la quantité d'enzyme (en g pour les préparations solides ou en mL pour les préparations liquides) pour obtenir un

DH_{TCA} de 20 %. L'activité protéolytique (AP) correspondant au nombre d'unité U_{TCA} par g ou par mL d'enzyme est alors déduite.

Réactifs : réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma, 112K3645), acide trichloroactétique pur (Labosi, 2895229), NaOH (Merck, B575798 003).

Matériel : bain marie (Bioblock, Polystat 33), spectrophotomètre UV/Visible (LKB Biochrom, Novaspec 4049), filtre seringue (Millex, Millipore), pH-mètre (Radiometer, PHM 62).

II.2.2.2. Modélisation de l'activité protéolytique en fonction du pH et de la température.

L'équation choisie pour modéliser l'activité protéolytique des enzymes, AP, en fonction du pH et de la température est le polynôme du second degré suivant :

$AP = a_1 + (a_2 \times pH) + (a_3 \times T) + (a_4 \times pH \times T) + (a_5 \times pH^2) + (a_6 \times T^2)$,

avec : $a_{1,...}a_6$, constantes définissant le modèle ; T et pH : variables indépendantes, respectivement la température (°C) et le pH ; AP : variable dépendante, l'activité protéolytique en U_{TCA}/(g ou mL d'enzyme).

Afin de déterminer la valeur des constantes a_i, neuf expériences ont été réalisées correspondant à neuf couples pH/température différents. Ces couples expérimentaux ont été déterminés par D-optimalité. La figure M.II.1 présente les points expérimentaux pour chaque protéase. La détermination des paramètres a_i, permettant la résolution des modèles, est réalisée par un programme Matlab élaboré au sein du laboratoire.

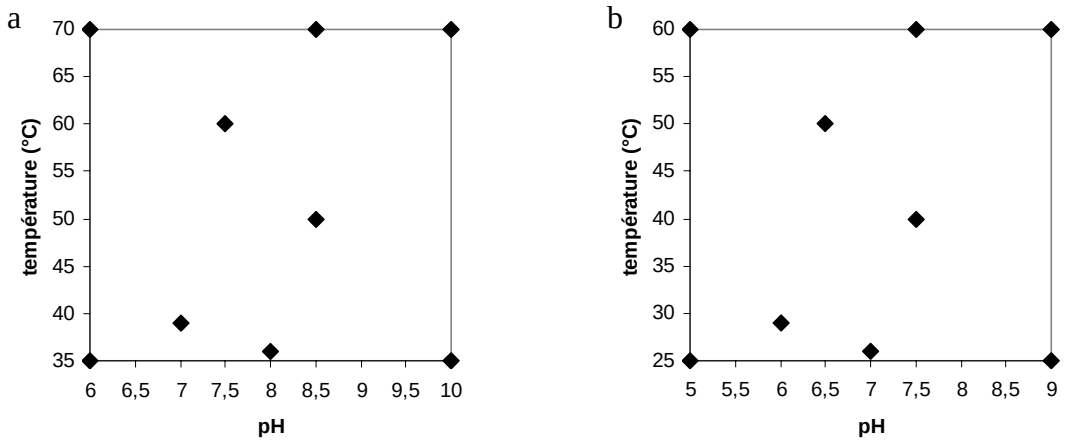


Figure M.II.1 : couples pH/température (°C) choisis pour la résolution des modèles. (a) : pour l'Alcalase 2,4L, l'Espérase 7,5L, la Lypaïne 6500 et l'Orientase 90 N. (b) : pour la Neutrase 0,8L, la Prolyve BS et la Pronase SG.

Les résultats peuvent être visualisés en trois dimensions puisque la modélisation comprend deux variables indépendantes (pH et T) et une variable dépendante (AP). Cependant, la représentation en deux dimensions, correspondant aux courbes d'isoréponse de l'activité protéolytique (AP), est préférée pour des questions de lisibilité du graphique et de comparaison.

Une analyse statistique des données est effectuée en déterminant le coefficient de corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs modélisées. Afin de vérifier graphiquement le modèle, un test de Student à 5 % d'erreur est réalisé sur la plus faible et la plus forte valeur de la variable dépendante.

II.3. MISE EN ŒUVRE DE L'HYDROLYSE ET SUIVI DE L'HYDROLYSE PAR LA METHODE PH-STAT.

II.3.1. Préparation du substrat et de la protéase pour l'hydrolyse.

L'action hydrolytique d'enzymes nécessite la mise en suspension préalable du substrat protéique au pH et à la température réactionnels. Pour cela, le substrat protéique est homogénéisé avec de l'eau déminéralisée à la concentration protéique désirée : 5, 10, 18,8, 40, 64, 81, 100 ou 130 g/L (N × 6,25). Comme réalisé par Kristinsson et Rasco (2000a), la quantité de substrat prélevée a été calculée grâce aux formules suivantes :

$$M_{prot} = M_T \times (S / 100)$$

$$M_{substrat} = M_{prot} \times (100 / P)$$

$$M_{eau} = (M_T - M_{enz}) - M_{substrat}$$

M_{prot} : masse de protéines (g)
M_T : masse totale du mélange (g)
S : concentration protéique dans le milieu réactionnel (%)
$M_{substrat}$: masse de matière première (g)
M_{eau} : masse d'eau (g)
P : pureté protéique du substrat (%)
M_{enz} : masse de la préparation enzymatique (g)

L'homogénéisation est réalisée dans le réacteur où s'effectue l'hydrolyse, à 600 trs/mn et à la température réactionnelle. Par l'intermédiaire d'un logiciel (Tinet 2.4, Metrohm), le pH est progressivement et automatiquement ajusté au pH désiré par ajout de NaOH 1 N. La durée de cet ajustement du pH est d'environ 30 mn. Le volume de soude ajouté est très faible (< 5 % du mélange), c'est pourquoi, la dilution du substrat est considérée comme négligeable.

Une quantité (g ou mL) de protéase 10 fois supérieure à celle nécessaire pour l'hydrolyse est diluée 10 fois avec de l'eau déminéralisée (volume final = 10 mL). La préparation enzymatique est ajustée au pH réactionnel par ajout de NaOH 1 N ou d'HCl 1 N. Le volume de protéase nécessaire prenant en compte la dilution (≈ 1 mL) est alors prélevé.

II.3.2. Suivi de l'hydrolyse par la méthode du pH-Stat.

L'hydrolyse enzymatique des protéines est réalisée selon la technique du pH-Stat développée par Adler-Nissen (1978, 1986, 1987). Elle est basée sur le maintien du pH constant par titration automatique, avec une base, des protons libérés au cours de l'hydrolyse. Le dispositif expérimental du suivi de l'hydrolyse par la méthode du pH-Stat est schématisé dans la figure M.II.2..

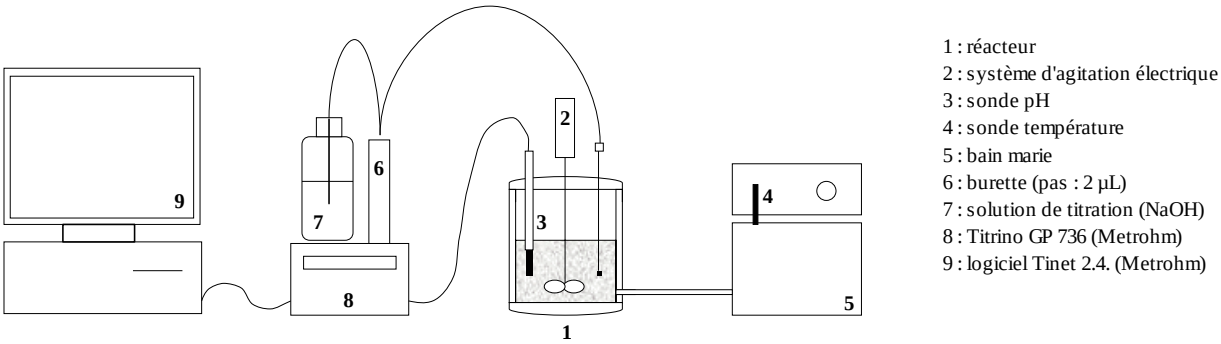


Figure M.II.2 : schéma du dispositif expérimental pour le suivi de l'hydrolyse par la méthode du pH-Stat.

La méthode du pH-Stat n'est fonctionnelle qu'aux pH où la dissociation des groupes α-aminés est significative, c'est-à-dire aux pH supérieurs à 6,5 (Adler-Nissen, 1987). Ainsi, à pH neutre ou alcalin, la baisse de pH est compensée par l'ajout continuel d'une base (NaOH, KOH ou $Ca(OH)_2$). A pH et température constants, la valeur moyenne des pK des groupements α-aminés est considérée constante. Pour les polypeptides, le pK des groupements α-aminés est de 7,5 - 7,8 à 25 °C avec une enthalpie d'ionisation comprise entre 40 et 50 kJ / éqv de NH_2. Dans ce travail, la valeur de pK a été calculée selon la formule établie par Steinhardt et Beychok (1964) :

$$pK = 7{,}8 + \frac{(298 - T)}{(298 \times T)} \times 2400$$

pK : pK moyen des groupes α-aminés
T : température en Kelvin

A pH et température constants et en supposant que la valeur de pK des groupes α-aminés reste constante, il existe alors une proportionnalité entre la libération des protons et la quantité de liaisons peptidiques clivées (Adler-Nissen, 1982, 1987). Ce facteur de proportionnalité est le coefficient de dissociation des groupements α-aminés, α :

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}}$$

pK : pK moyen des groupes α-aminés
α : degré de dissociation moyen des groupements α-aminés libérées

Le degré d'hydrolyse (DH) est défini (en %) comme étant le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées (h) sur le nombre de liaisons peptidiques totales (h_{tot}).

La relation entre le DH et la consommation de base est donnée par l'équation suivante (Adler-Nissen, 1982, 1987) :

$$DH\ (\%) = \frac{B \times N_b}{\alpha \times Mp \times h_{tot}} \times 100$$

B : consommation de base (mL)
N_b : normalité de la base (N)
α : degré moyen de dissociation de groupements α -aminés
h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques du substrat protéique (méqv/g protéine)
Mp : masse de protéine (N × facteur de Kjeldahl) (g)

L'ajout de base au cours de l'hydrolyse provoque une dilution du substrat. C'est pourquoi, la concentration de la base utilisée ne doit pas être trop faible afin de ne pas trop diluer le substrat. L'effet de cette dilution sur le DH est considéré comme négligeable (Adler-Nissen, 1982).

Dans cette étude, nous avons choisi une valeur de h_{tot} égale à 7,8 qui est une valeur classiquement utilisée dans la littérature pour les protéines de colza (Schweizer, 2002).

II.3.3. Mise en œuvre de l'hydrolyse.

Le procédé d'hydrolyse est réalisé en réacteur discontinu. Ce procédé classique présente certains avantages, tant au niveau matériel (investissement), que technologique (possibilité d'étude cinétique, facilité de régulation et de nettoyage).

Le réacteur utilisé est à double paroi, d'une capacité de 100 mL et agitée à vitesse variable grâce à une hélice. Les hydrolyses sont réalisées dans un volume réactionnel de 60 ou 65 mL.

Le mélange réactionnel est agité à 600 tr/mn. La température dans le réacteur est maintenue constante par circulation d'eau issue d'un bain marie à température réglable. La mesure et le contrôle de pH se font par un pH-Stat Titrino GP 736 (Metrohm). Une solution de soude 1 N (quelquefois de normalité inférieure) est utilisée pour ajuster et réguler le milieu réactionnel. L'incrément de la burette est de 2 µL. Le Titrino GP 736 est connecté à un logiciel sur un ordinateur, Tinet 2.4 (Metrohm), par lequel le pH et la durée de l'hydrolyse sont fixés. Le programme permettant ce contrôle a été réalisé au sein du laboratoire.

L'initialisation de la réaction se fait par l'ajout de l'enzyme. Afin de caractériser l'hydrolyse chimique des protéines et de s'assurer du fait qu'il n'y ait pas de contamination bactérienne, des expériences sans enzyme sont aussi effectuées. La durée des hydrolyses varie entre 3 et 13 heures. Les cinétiques d'hydrolyse (volume de NaOH en fonction du temps) sont enregistrées

toutes les 50 s pour les hydrolyses de courte durée (≤ 3 h) et toutes les 5 mn pour les hydrolyses d'une durée supérieure à 3 h.

La réaction enzymatique est stoppée en immergeant le milieu réactionnel dans un bain marie à 95 °C pendant 10 mn afin de dénaturer thermiquement la protéase. Puis le mélange est placé 30 mn à 5 °C avant d'être congelé à – 80 °C et lyophilisé.
L'inactivation complète des protéases a été vérifiée par la méthode utilisée par Mutilangi *et al.* (1995). Pour cela, des hydrolysats ayant préalablement subi le traitement d'inactivation thermique des protéases, ont été replacés dans le réacteur à pH 7,5 et 40 °C (conditions où les phénomènes de dégradation chimique des substrats sont négligeables) et l'ajustement du pH est contrôlé par la méthode pH-Stat. Le volume de soude est suivi pendant 1 h. Quelle que soit l'enzyme, aucune addition significative de NaOH n'a été observée, suggérant une inactivation complète des protéases lorsque le mélange réactionnel est chauffé 10 mn à 95 °C.

Réactifs : Eau milliQ (Millipore milli-RO), NaOH (Merck, B575798 003).
Matériel : système de régulation du pH (Titrino 736 GP, Metrohm), agitateur à hélice (Stirrer 722, Metrohm), logiciel pH-Stat (Tinet 2.4, Metrohm), bain thermostaté (Polystat 11, Bioblock), réacteur de 100 mL (Metrohm), pH-mètre (PHM 62, Radiometer), balance de précision (Mettler AT200, Mettler Toledo), lyophilisateur (modèle DW3, Heto DryWinner).

II.4. CALIBRATION DE LA METHODE DU PH-STAT AVEC CELLE AU TNBS.

La méthode au TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique) permet de quantifier le DH par dosage spectrophotométrique des chromophores formés suite à la réaction entre le TNBS et les groupements α-aminés libérés au cours de l'hydrolyse. La corrélation entre le DH obtenu par la méthode pH-Stat, DH, et celui déterminé par la méthode au TNBS, DH_{TNBS}, a été réalisée.
La détermination du DH_{TNBS} a été réalisée suivant la méthode décrite par Adler-Nissen (1979). Les hydrolysats lyophilisés obtenus par la méthode du pH-Stat et caractérisés par différentes valeurs de DH, ainsi que des solutions standard de L-leucine, sont préparés dans une solution de SDS à 1 % (p/v) respectivement à 7,5 g/L et entre 0 – 4 mM. Des aliquots de chaque mélange (0,25 mL) sont placés dans des tubes à essais. Puis, 2 mL d'une solution tampon de phosphate de sodium (0,2 M, pH 8,2) et 2 mL d'une solution de TNBS à 0,1 % sont ajoutés dans les tubes. Les échantillons sont vortexés et placés, à l'abri de la lumière, dans un bain-marie à 50 °C pendant 1 h. Après l'incubation, la réaction est arrêtée par

addition de 4 mL d'HCl 0,1 N et le mélange est refroidi pendant 30 mn à température ambiante. L'absorbance est lue à 340 nm.

Les valeurs de DH_{TNBS} sont calculées d'après la formule suivante :

$$DH_{TNBS}\ (\%) = \frac{(AN_2 - AN_1)}{Npb} \times 100$$

AN_1 et AN_2 représentent respectivement le contenu en groupements aminés du substrat protéique avant l'hydrolyse et celui après l'hydrolyse, en mg/g de protéines. Npb représente le contenu en azote aminé des liaisons peptidiques dans le substrat protéique, en mg/g de protéines (Npb = 128,2 mg/g pour les protéines de colza). La concentration en azote aminé des échantillons est calculée grâce à la courbe étalon de la figure M.II.3 qui représente l'absorbance à 340 nm en fonction de la concentration en azote aminé L-leucine, en mg/L. Les valeurs de AN_1 et AN_2 sont alors obtenues en divisant le contenu en azote aminé des échantillons par leur contenu en protéines (g/L).

Réactifs : L-leucine (Sigma), acide pycrylsulfonique 5 % (p/v) (Sigma, 083K5000), SDS (Sigma, 103K0066).

Matériel : spectrophotomètre UV/Vis (Cary 100 Bio, Varian), bain-marie (Polystat 22, Bioblock).

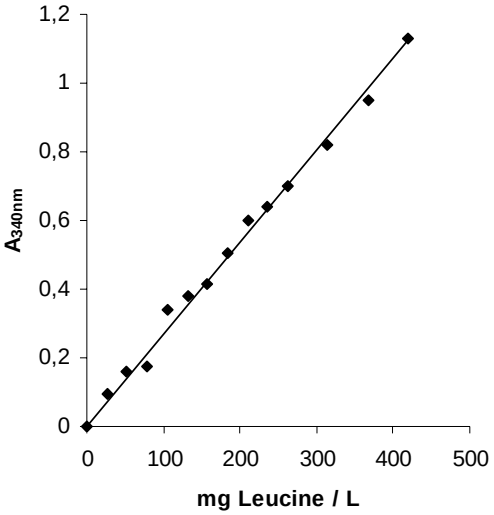


Figure M.II.3 : courbe d'étalonnage (mg de L-leucine / L en fonction de l'absorbance à 340 nm) pour la détermination de la concentration en azote aminé des hydrolysats.

II.5. ETUDE CINETIQUE.

Les études cinétiques se basent sur le schéma réactionnel de Michaelis-Menten :

$$\mathbf{E + S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathbf{ES} \xrightarrow{k_2} \mathbf{E + P}$$

E : enzyme active
S : substrat
ES : complexe enzyme-substrat
P : produit
k_1, k_{-1}, k_2 : constantes de vitesse

II.5.1. Détermination des constantes cinétiques Km, Vm et k_2.

L'équation de Michaelis-Menten décrit les réactions catalysées par des enzymes avec la formation d'un complexe intermédiaire ES. La relation hyperbolique entre la vitesse initiale (Vo) et la concentration initiale de substrat (So) proposée par ces auteurs est la suivante :

$$\mathbf{Vo} = \frac{\mathbf{Vm \times So}}{\mathbf{Km + So}}$$

Avec : $\mathbf{Vm = k_2 \times Eo}$

et : $\mathbf{Km = (k_{-1} + k_2) / k_1}$.

Vo : vitesse initiale d'hydrolyse (g/L.h)
So : concentration initiale de substrat (g/L)
Km : constante de Michaelis-Menten (g/L)
Vm : vitesse maximale d'hydrolyse (g/L.h)
k_1, k_{-1}, k_2 : constante de vitesse (h^{-1})

Il existe plusieurs représentations pour la détermination des paramètres cinétiques. Dans cette étude, nous avons utilisé la représentation de Lineweaver-Burk :

$$\frac{\mathbf{1}}{\mathbf{Vo}} = \frac{\mathbf{Km}}{\mathbf{Vm}} \times \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{So}} + \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{Vm}}$$

En traçant 1/Vo en fonction de 1/So, il est obtenu une droite dont la pente est égale à Km/Vm et l'ordonnée à l'origine est égale à 1/Vm. Ainsi, pour déterminer les constantes cinétiques, nous avons déterminé les valeurs de Vo pour différentes valeurs de So mais pour des valeurs de Eo, de pH et de T constantes. La vitesse initiale, Vo, d'une cinétique est, en règle générale, déterminée en traçant la tangente à l'origine. Toutefois, en traçant la tangente manuellement, cette méthode peut s'avérer assez approximative. C'est pourquoi, comme préconisé par Adler-Nissen (1978), nous avons considéré que la vitesse est constante lors des 5 premières minutes d'hydrolyse et nous avons calculé la vitesse initiale de la manière suivante :

$$\mathbf{Vo} = \frac{\mathbf{DH_{5mn} \times So \times 60}}{\mathbf{100 \times 5}}$$

Vo : vitesse initiale (g/L.h)
So : concentration initiale en substrat (g/L)
DH_{5mn} : degré d'hydrolyse à 5 mn (%)

En utilisant le DH_{5mn}, les constantes cinétiques sont apparentes d'où la détermination d'un Km apparent, noté Km (g/L), d'un Vm apparent, noté Vm (g/L.h) et d'un k_2 apparent, noté k_2 (h^{-1}).

II.5.2. Dénaturation thermique et activation thermique des enzymes.

II.5.2.1. Dénaturation thermique des enzymes.

Des solutions enzymatiques (10 mL), soit d'Alcalase 2,4L à 30 mL/L, soit de Pronase SG à 6 g/L, sont incubées à différentes températures, entre 37 et 65 °C. Après une durée variant de 10 à 120 mn, 1 mL d'échantillon est prélevé et est dilué 10 fois. Le pH de l'échantillon est alors ajusté au pH de l'hydrolyse. Puis 1 mL de la solution enzymatique est prélevé et une réaction d'hydrolyse est réalisée pendant 10 mn avec l'isolat de globulines (préparé dans ce travail) à 10 g/L (volume réactionnel final de 60 mL) et à pH 8 et 50 °C pour l'Alcalase 2,4L ou à pH 7,7 et 37 °C pour la Pronase SG. Les ratios Eo/So sont respectivement de 0,5 % et de 0,1 % pour les hydrolyses avec l'Alcalase 2,4L et pour les hydrolyses avec la Pronase SG ; ces ratios évitant la limitation en substrat. La vitesse initiale avec la protéase chauffée est alors déterminée. L'activité enzymatique résiduelle est calculée d'après la formule suivante :

$$\text{Activité enzymatique résiduelle (\%)} = \frac{\text{Vo avec l'enzyme ayant subi le traitement thermique (g/L.h)}}{\text{Vo avec l'enzyme n'ayant pas subi le traitement thermique (g/L.h)}} \times 100$$

Les courbes de l'activité résiduelle de l'enzyme en fonction de la durée d'incubation pour différentes températures permet de déterminer la constante d'activation de dénaturation des enzymes, Ed. Si la vitesse de dégradation de l'enzyme obéit à une loi du premier ordre par rapport à la concentration d'enzyme active et suit la loi d'Arrhénius, alors la vitesse de dénaturation de l'enzyme, r_d, s'écrit :

$$r_d = -k_d \times E$$

et

$$k_d = k_{do} \times \exp(-Ed/RT)$$

r_d : vitesse de dénaturation de l'enzyme (mL/L.mn ou g/L.mn)
k_d : constante de dénaturation de l'enzyme à une température donnée (mn^{-1})
k_{do} : constante d'Arrhénius de dénaturation (mn^{-1})
E : concentration d'enzyme active (mL/L ou g/L)
Ed : énergie d'activation de la dénaturation (J/mol)
T : température (K)
R : constante des gaz parfaits (J/mol.K)

Dans un réacteur fermé, un bilan de matière sur l'enzyme donne :

$$d(E) / d(t) = -k_d \times E$$

d'où par intégration : $E = Eo \times \exp(-k_d t)$, avec Eo, la concentration initiale d'enzyme (mL/L ou g/L).

Or, si les vitesses initiales sont considérées, celles-ci sont directement proportionnelles à la quantité d'enzyme active : (E / Eo) = (Vo au temps t / Vo initiale) = activité résiduelle. La relation entre la vitesse initiale (Vo) et la vitesse initiale au temps t (Vot) est donc de type exponentielle : $Vot = Vo \times \exp(-k_d t)$, et les courbes Ln(activité résiduelle) en fonction du temps sont des droites de pente $-k_d$.

Si la vitesse d'inactivation de l'enzyme obéit à une loi du second ordre par rapport à la concentration d'enzyme active, alors, dans ce cas, la vitesse d'inactivation de l'enzyme, r_i, s'écrit :

$r_i = -k_i \times E^2$

r_i : vitesse d'inactivation de l'enzyme (mL/L.min)
k_i : constante d'inactivation de l'enzyme à une température donnée (L/mL.min)
E : concentration d'enzyme active (mL/L)

Dans un réacteur fermé, le bilan de matière sur l'enzyme conduit à :

$d(E) / E^2 = -k_i \times d(t)$

d'où par intégration : $E / Eo = 1 / (Eo \times k_i t + 1)$, avec Eo, la concentration initiale d'enzyme active (mL/L), d'où :

$1 / E = 1 / Eo + k_i t$.

Or, si les vitesses initiales sont considérées, celles-ci sont directement proportionnelles à la quantité d'enzyme active : (E / Eo) = (Vo au temps t / Vo initiale) = activité résiduelle.

La relation entre la vitesse initiale (Vo) et la vitesse initiale au temps t (Vot) est donc :

$Eo / E = Eo \times k_i t + 1$, et les courbes Eo / E en fonction du temps sont des droites de pente $Eo \times k_i$.

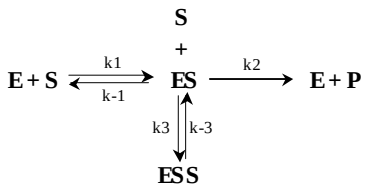
II.5.2.2. Activation thermique des enzymes.

Dans ce cas, les solutions enzymatiques n'ont subi aucune incubation initiale. Le substrat (isolat de globulines à 40 g/L) est porté à la température choisie avant l'ajout de la solution enzymatique. Pour l'Alcalase 2,4L, les hydrolyses sont réalisées à une Eo de 0,8 mL/L et à pH 8, tandis que pour la Pronase SG, les hydrolyses sont effectuées à une Eo de 0,084 g/L et à pH 7,7.

II.5.3. Mise en évidence des phénomènes impliqués dans l'hydrolyse.

II.5.3.1. Inhibition des protéases par un excès de substrat.

L'inhibition d'une enzyme par excès de substrat est généralement formalisée de la manière suivante :



E : enzyme active
S : substrat
So : concentration initiale en substrat
ES : complexe enzyme-substrat
ESS : complexe enzyme-susbtrat-susbtrat
P : produit
k_1, k_{-1}, k_2, k_3, k_{-3}: constantes de vitesse
K_M : constante de Michaelis-Menten (quantité/volume)
V_M : vitesse maximale (quantité/(volume.temps))
K_{SS} : constante d'équilibre entre ES et ESS

Il peut alors être établi les équations suivantes :

$$Vo = \frac{V_M \cdot So}{K_M + So + (So^2/Kss)} \quad \text{avec} \quad K_M = \frac{E \cdot S}{ES}, \quad Kss = \frac{ES \cdot S}{ESS} \quad \text{et} \quad V_M = k_2 \cdot E_0$$

Les courbes Vo en fonction de So présentent alors un maximum pour des concentrations élevées en So.

II.5.3.2. Evolution de la nature du substrat au cours de l'hydrolyse.

Les constantes cinétiques apparentes, Vm et Km, caractéristiques d'un système enzyme – substrat donné, peuvent varier au cours de l'hydrolyse suite à une évolution de la nature du substrat. C'est pourquoi, nous avons déterminé ces constantes, que nous noterons Vm* et Km*, sur des substrats pré-hydrolysés. Pour cela, nous avons utilisé la méthode d'Adler-Nissen (1978) avec quelques modifications.

Dans un premier temps, pour chaque système enzyme – substrat étudié, nous avons préparé des hydrolysats caractérisés par des DH différents. Ces hydrolysats ont été préparés par la méthode pH-Stat, avec des So variant de 40 à 100 g/L. Dans un deuxième temps, les vitesses initiales à différentes concentrations initiales en hydrolysat, $So_{hydrolysat}$ (5, 10, 18,8 et 40 g/L) ont été déterminées. Les Eo utilisées sont identiques à ceux utilisés ultérieurement, à savoir une valeur de Eo de 0,8 mL/L pour l'Alcalase 2,4L et une valeur de Eo de 0,084 g/L pour la Pronase SG. Les constantes Vm* et Km* ont été déterminées avec la représentation de Lineweaver et Burk et leur évolution en fonction du DH a alors été tracée.

II.5.3.3. Inactivation enzymatique au cours de l'hydrolyse.

** Remplacement de l'enzyme par ajout d'enzyme fraîche.*

L'inactivation des enzymes avec l'avancement de la réaction est mise en évidence en remplaçant l'enzyme par de l'enzyme fraîche à un temps donné de l'hydrolyse.

Pour cela, dans un premier temps, les substrats protéiques ont été hydrolysés dans des conditions opératoires définies (Alcalase 2,4L : pH de 8, T de 50 °C, Eo de 0,8 mL/L et durée de 13 h ; Pronase SG : pH de 7,7, T de 37 °C, Eo de 0,084 mL/L et durée de 7 h). Les cinétiques obtenues constituent les courbes de référence.

Dans un deuxième temps, les substrats protéiques ont été hydrolysés de la même manière que pour l'obtention des courbes de référence, à l'exception du fait que la réaction est arrêtée, par inactivation thermique de l'enzyme, à un temps donné, t. L'hydrolysat obtenu est hydrolysé à nouveau avec de l'enzyme fraîche dans les mêmes conditions réactionnelles. Le volume de soude ajouté en 5 mn, Vol_2, est proportionnel à la vitesse initile atteinte au temps t de l'hydrolyse. Ce volume de soude est comparé au volume de soude qui est ajouté lorsque l'enzyme n'est pas remplacée par de l'enzyme fraîche (noté Vol_1). L'activité résiduelle de l'enzyme au temps t est alors calculée par la formule suivante :

Activité résiduelle de l'enzyme (%) = $(Vol_1 / Vol_2) \times 100$.

** Test de Selwyn.*

Le test de Selwyn permet de savoir si la diminution de l'activité d'une enzyme est provoquée par une inactivation de l'enzyme plutôt que par la disparition du substrat ou par une inhibition par le produit, P.

D'après Cornish-Bowden *et al.* (2004), il a été montré qu'aussi longtemps que la vitesse dP/dt reste proportionnelle à la concentration initiale en enzyme Eo, cette vitesse peut être exprimée comme le produit de la constante Eo et d'une fonction dépendante des concentrations instantanées de substrat, de produit, d'inhibiteur et de toute autre espèce (autre que l'enzyme) qui peut être présente dans le mélange. Ces concentrations peuvent être calculées à partir de la stoechiométrie de la réaction et de la concentration de P à n'importe quel temps. Ainsi l'équation de la vitesse peut être écrite sous une forme simple : $dP/dt = Eo \times f(P)$,

où f est une fonction qui peut en principe être dérivée à partir de l'équation de vitesse. Le fait que f soit difficile à dériver ou que son expression soit compliquée n'a pas d'importance, parce que la connaissance de la forme exacte de la fonction n'est pas nécessaire. Il faut

toutefois qu'elle soit dépendante de Eo et de t, et donc que la forme intégrée de l'équation précédente soit : $Eo \times t = F(P)$,

où F est une autre fonction. L'importance pratique de cette équation est qu'elle montre que la valeur de $Eo \times t$, après qu'une quantité donnée de produit se soit formée, est indépendante de Eo. En conséquence, si des courbes d'avancement de réaction sont mesurées pour diverses valeurs de Eo mais en maintenant identique le pH et la température, les courbes de P en fonction de $Eo \times t$ devraient être superposables quelle que soit la valeur de Eo. Si elles ne le sont pas, l'hypothèse initiale selon laquelle la vitesse doit être proportionnelle à la concentration initiale d'enzyme durant toute la réaction, est incorrecte.

D'après González-Tello *et al.* (1994a), pour un système protéase/protéine donné, la vitesse d'hydrolyse, r, à pH et température constants est :

$$r = So \times d(DH)/dt = F(So, DH) \times E \qquad (a)$$

DH : degré d'hydrolyse
E : concentration en enzyme active
Eo : concentration initiale en enzyme
k_d : constante cinétique de dénaturation

Après la séparation des variables et l'intégration de (a),

- s'il n'y a pas de dénaturation thermique irréversible, alors :

$$\int_0^{DH} d(DH)/F(So, DH) = Eo \times t \qquad (b)$$

- si la dénaturation est de second ordre pour la protéase, alors : $-dE/dt = k_d \times E^2$ (c)

  et l'intégration de (a) donne :

$$\int_0^{DH} d(DH)/F(So, DH) = 1/k_d \times Ln\,(1 + k_d \times Eo \times t) \qquad (d)$$

Les équations (b) et (d) montrent une relation univoque entre le DH et le produit $Eo \times t$: si les courbes DH en fonction de $Eo \times t$ se superposent alors soit il n'y a pas de dénaturation irréversible de l'enzyme, soit il existe une dénaturation du second ordre pour la protéase.

II.5.3.4. Autolyse des enzymes.

Afin de mettre en évidence l'existence ou non d'un phénomène d'autolyse des enzymes, nous avons solubilisé les enzymes seules dans le réacteur thermostaté. Le mélange est ajusté au pH et à la température désirés à l'aide du système pH-Stat (NaOH = 0,5 N). Les conditions de pH et de température sont similaires à celles du paragraphe II.5.3.3. Les concentrations d'enzyme sont respectivement de 4 mL/L pour l'Alcalase 2,4L et de 1,2 g/L pour la Pronase SG.

Tout ajout de soude 0,5 N afin de maintenir le pH constant au cours des trois heures de solubilisation des enzymes est enregistré. Des expériences similaires sont également effectuées en présence de 0,5 g/L de PMSF (Fluorure de phényl méthanesulfanyl) qui est un puissant inhibiteur des protéases à sérine.

Chaque solution de protéase est ensuite lyophilisée. Les poudres obtenues sont solubilisées à 20 g/L dans de l'eau déionisée et les solutions sont filtrées sur un filtre seringue de 0,22 µm. Des témoins sont réalisés en procédant de la même manière à l'exception du fait que les enzymes ne sont solubilisées que pendant 5mn. Les échantillons sont analysés par CLHP-ET et CLHP-PI.

II.5.3.5. Inhibition par les produits finaux de l'hydrolyse.

L'inhibition des enzymes par les produits finaux de l'hydrolyse a été caractérisée en hydrolysant le substrat frais en présence de substrat pré-hydrolysé de DH élevé. Ce dernier est appelé « inhibiteur ». Les « inhibiteurs » utilisés sont des hydrolysats caractérisés par des DH de 25,2 %, de 21,2 % et de 21,7 % respectivement pour les systèmes Alcalase 2,4L/Globuline, Pronase SG/Globuline et Alcalase 2,4L/Albumine.

Nous avons alors déterminé si la présence de l'« inhibiteur », en quantité importante (9 g/L), modifie les valeurs des constantes cinétiques, Vm et Km (qui ont préalablement été déterminées sans « inhibiteur »).

Dans les mêmes conditions réactionnelles utilisées pour déterminer Vm et Km, nous avons déterminé les Vo obtenus par hydrolyse de solutions contenant 5, 10, 18,8 ou 40 g/L de substrat frais et 9 g/L d'« inhibiteur ». Ainsi, les constantes cinétiques apparentes en présence d' « inhibiteur » (la vitesse maximale apparente, Vmi, et la constante d'affinité apparente, Kmi) ont été calculées en traçant la représentation de Lineweaver et Burk.

Lors de ces expériences, nous avons considéré que le substrat pré-hydrolysé n'est pas prioritairement hydrolysé lorsque du substrat neuf est présent dans le milieu réactionnel. Si l'inverse était considéré, le faible volume de soude ajouté lors de l'hydrolyse de l'inhibiteur seul (de 0,006 à 0,026 mL selon l'hydrolysat « inhibiteur ») peut être considéré comme négligeable.

II.6. MODELISATION PHENOMENOLOGIQUE DES CINETIQUES D'HYDROLYSE.

La figure M.II.4 présente la démarche mise en œuvre pour l'élaboration des modèles. Elle a nécessité deux phases. La première phase a consisté en :

- la définition des paramètres caractérisant le système considéré (Km, Vm, DH…) ;
- l'obtention de faits expérimentaux quantitatifs (cinétiques d'hydrolyse,…) ;
- la mise en évidence des phénomènes impliqués dans l'hydrolyse.

La seconde phase d'élaboration des modèles a consisté :

- à l'écriture de relations mathématiques basées sur les hypothèses précédentes ;
- à la confrontation de ces expressions mathématiques à l'expérience ;
- à la confirmation ou l'infirmation de la formalisation effectuée ;
- à la modification de la formalisation.

Le système d'équations différentielles est intégré par la méthode de Runge-Kutta d'ordre 4, tandis que les paramètres à identifier sont déterminés par minimisation d'une fonction objective J de type moindre carré. Dans notre cas : $J = \sum(\sum (DH_{expérimental} - DH_{modélisé})^2)$. Pour cette étape, la méthode d'optimisation employée est celle du Simplexe.

Les différents programmes permettant l'intégration numérique et la minimisation de la fonction erreur ont été réalisés au laboratoire sous Matlab®.

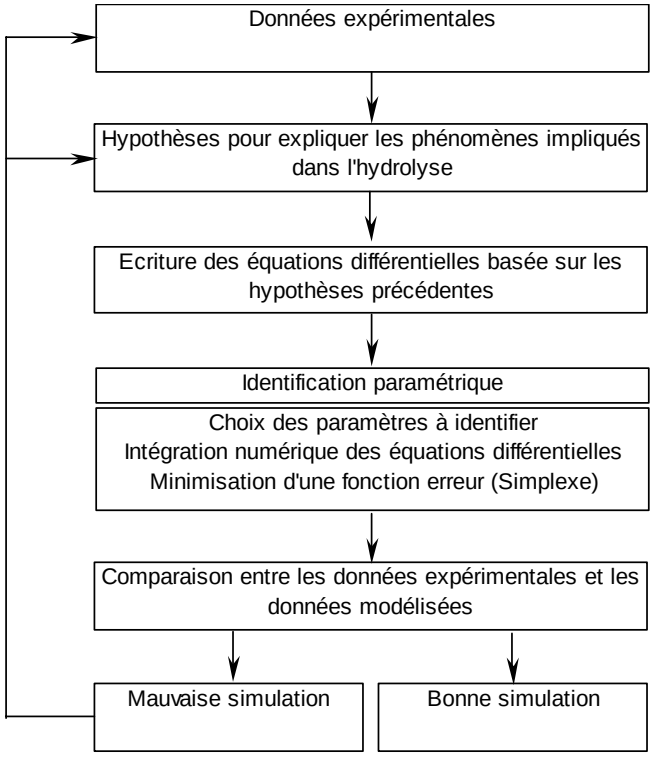


Figure M.II.4 : démarche suivie pour l'élaboration des modèles de la protéolyse.

III. METHODES ANALYTIQUES.

III.1. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES SUBSTRATS ET DES HYDROLYSATS.

III.1.1. Teneur en protéines totales.

La teneur protéique est déterminée suite au dosage de l'azote total par la méthode Kjeldahl, suivant la méthode utilisée par Schweizer (2002). Cette méthode de dosage est basée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme de sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$. Le dosage, dupliqué deux fois, est réalisé de façon automatique avec un Vapodest 4S. Il est également nécessaire de faire un dosage de l'azote de l'air pour obtenir, après soustraction, une valeur de l'azote total réellement contenu dans l'échantillon.

Le taux d'azote de l'échantillon, en pourcentage, est alors calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'azote (\%)} = (H - H_0) \times N \times 1400 / Ec$$

H : volume d'H_2SO_4 nécessaire à la titration de l'échantillon (mL)
H_0 : volume d'H_2SO_4 nécessaire à la titration du blanc (mL)
N : titre de la solution d'H_2SO_4 (mol/L)
Ec : prise d'échantillon (mg)

La teneur en protéines est obtenue à l'aide du facteur de conversion azote/protéine (f_N) grâce à la formule suivante : Teneur en protéines (%) = $f_N \times$ taux d'azote.

Afin de faciliter la comparaison des résultats obtenus avec ceux de la littérature, la valeur du facteur f_N utilisée dans cette étude est celle des protéines végétales (égale à 6,25). Notons, cependant, que le facteur f_N des protéines d'oléagineux a une valeur de l'ordre de 5,3-5,4 et non de 6,25 (Mossé, 1990).

Réactifs : catalyseur de minéralisation (Na_2SO_4 17 % ; $CuSO_4$. 5 H_2O 1,5 % ; sels 1,5 %) (Prolabo, 22550-293), H_2SO_4 1 N (Labosi, A4715891), H_2O_2 35 % (Labosi, A4823251), NaOH 40 % (Merk, 191537), H_3BO_3 (Labosi, A4703851).

Matériel : appareil de Kjeldahl automatique Vapodest 4 titramatic (Gerhardt GmbH & Co. KG), système de titrage automatique 645 Multi-dosimat (Metrohm), banc de minéralisation Kjeldatherm® KT 12S (Gerhardt GmbH & Co. KG).

III.1.2. Humidité et teneur en cendres.

L'humidité est déterminée en plaçant l'échantillon (1 à 5 g) dans une étude ventilée à 105 °C pendant 48 heures. A la sortie de l'étuve, avant la pesée de la matière sèche, les échantillons

sont placés dans un dessiccateur et refroidis à température ambiante. La différence de masse observée correspond à la quantité d'eau évaporée.
Les cendres sont déterminées en plaçant l'échantillon (300 à 500 mg) dans un four à moufle, jusqu'à calcination complète (600 °C pendant 12 heures). La teneur en cendres se calcule alors comme étant le rapport entre le poids de l'échantillon après calcination et celui de la matière sèche.

Matériel : étuve (Memmert Roucaire), four à moufle (Pyrolabo).

III.1.3. Teneur en lipides.

La méthode utilisée est celle de l'AOAC (1984). L'échantillon lyophilisé (3 à 5 g) est placé dans une cartouche de cellulose et est délipidé au n-hexane dans un appareil de Soxhlet pendant 5 h. La matière grasse est déterminée en évaporant, sous vide, le solvant d'extraction avec un extracteur rotatif de vapeur et en pesant la matière lipidique extraite qui a préalablement été séchée à 105 °C pendant 24 h. La teneur en lipides est égale au rapport entre la masse de la matière grasse extraite et séchée et la masse de la matière sèche de l'échantillon.

Réactif : n-hexane (Merk, 311761).
Matériel : chauffe ballon (Prolabo), extracteur rotatif de vapeur (rotavapor Büchi), étuve (Memmert Roucaire).

III.1.4. Teneur en polyphénols.

III.1.4.1. Teneurs en polyphénols totaux et en tanins.

La teneur en polyphénols totaux est déterminée suivant la méthode de Makkar *et al.* (1993) qui s'appuie sur le fait que les composés phénoliques sont des molécules réductrices. Pour déterminer la teneur en tanins, cette méthode est couplée avec l'utilisation d'une matrice insoluble, le polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) qui fixe spécifiquement les tanins.
L'échantillon (200 mg) est placé dans un bécher de 25 mL dans lequel sont ajoutés 10 mL d'acétone à 70 %. Le bécher est placé dans un bain à ultrasons et soumis à un traitement ultrasonique pendant 20 mn à température ambiante. Le contenu du bécher est centrifugé 10 mn à 3000 g à 4 °C. Le surnageant est collecté et constitue l'extrait contenant les polyphénols totaux.

Des aliquots de l'extrait polyphénol (0,02 à 0,1 mL) sont placés dans des tubes à essais et complétés à 0,5 mL avec de l'eau distillé. Un volume de 0,25 mL de réactif de Folin-Ciocalteu 1 N et un volume de 1,25 mL de carbonate de sodium à 20 % (p/v) sont ajoutés successivement dans le tube à essais. Le tube est alors vortexé et l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 725 nm. La référence est réalisée à partir des mêmes quantités de réactif sans l'extrait polyphénol. La gamme étalon est réalisée de la même manière à partir d'une solution mère d'acide gallique à 0,1 mg/mL. La quantité de polyphénols totaux est déterminée en µg équivalent d'acide gallique à partir de la courbe étalon (figure M.III.1).

Pour la détermination des tanins totaux, 1 mL d'eau distillée et 1 mL d'extrait polyphénol sont ajoutés dans un tube à essais contenant 100 mg de PVPP. Le tube à essais est vortexé une première fois, placé à 4 °C pendant 15 mn dans une chambre froide, vortexé une deuxième fois puis centrifugé à 3000 g pendant 10 mn à 4 °C. Le surnageant, qui contient les polyphénols autres que les tanins, est collecté. Son contenu en polyphénols non-taniques est mesuré comme précédemment. La quantité en tanins est alors calculée en soustrayant la quantité en polyphénols non-taniques à la quantité en polyphénols totaux.
Les teneurs en polyphénols totaux ou en tanins sont calculées en divisant leur quantité par la matière sèche de l'échantillon initial.

Réactifs : polyvinyl polypyrrolidone (ISP Polyclar®VT, 03100051197), réactif de Folin-Ciocalteu 2 N (Sigma, 112K3645), carbonate de sodium (Prolabo, 92113), acide gallique 98 % (Acros Organics, A014986701).
Matériel : bain à ultrasons (Transsonic 460/H, Elma), centrifugeuse (Jouan M14.11), vortex (Top Mix, Bioblock), spectrophotomètre UV/Visible (Novaspec 4049, LKB Biochrom).

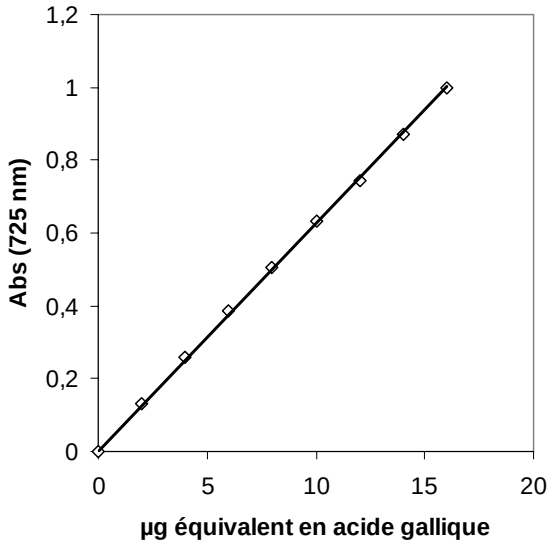


Figure M.III.1 : courbe d'étalonnage pour le dosage de la quantité de polyphénols en µg équivalent d'acide gallique. (Equation : $Abs_{725\ nm} = 0{,}0626 \times$ µg équivalent d'acide gallique).

III.1.4.2. Teneur en acides phénoliques totaux.

Les acides phénoliques totaux sont dosés selon la méthode de Xu et Diosady (1997).

Un échantillon de 2 g est agité trois fois avec 50 mL d'acétone à 60 % (ajusté à pH 3 avec de l'acide trichloroacétique 1 N) pendant 30 mn et centrifugé pendant 10 mn à 1800 g. Les surnageants sont combinés et l'acétone est évaporé sous vide à l'aide d'un extracteur rotatif. L'extrait est alors traité avec 20 mL de NaOH 4 N, pendant 4 h, afin d'hydrolyser les acides phénoliques estérifiés. La solution résultant de l'hydrolyse alcaline est acidifiée à pH 2 avec de l'HCl 10 N. Afin d'extraire les acides phénoliques restés insolubles dans l'acétone, le culot résiduel est agité avec 20 mL de NaOH 4 N pendant 4 h. Le mélange est aussi acidifié à pH 2 avec de l'HCl 10 N et est centrifugé 10 mn à 1800 g. Le surnageant est combiné avec l'extrait obtenu précédemment. L'extrait total est complété jusqu'à 100 mL avec de l'eau distillée. Un aliquot de 25 mL est prélevé pour être extrait 6 fois avec de l'éther éthylique/acétate d'éthyle (1/1, v/v) dans une ampoule à décanter. Les extraits organiques sont combinés et évaporés sous vide à température ambiante avec un extracteur rotatif de vapeur. Les acides phénoliques extraits sont alors dissous dans du méthanol.

A 0,25 mL d'échantillon ou d'une solution d'acide gallique de concentration connue (gamme étalon), sont ajoutés 3,5 mL d'eau distillée puis 0,25 mL de réactif de Folin-Denis. Après agitation au vortex, 0,5 mL de carbonate de sodium à 20 % (p/v) est ajouté et l'ensemble est vortexé. Le mélange est centrifugé à 3000 g pendant 15 mn puis laissé une heure à température ambiante avant d'être lu à 725 nm contre un blanc à base de méthanol. La courbe étalon est présentée dans la figure M.III.2.

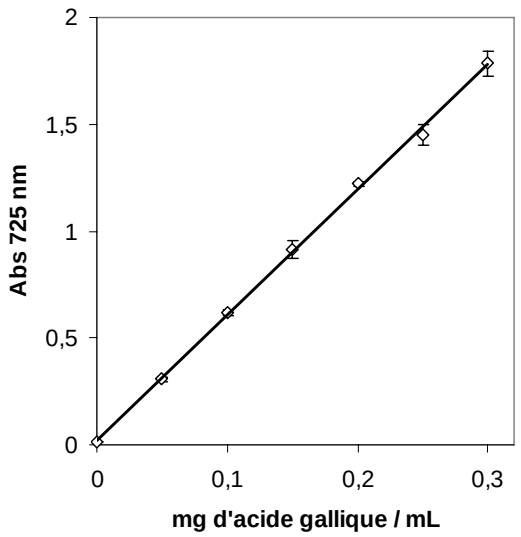


Figure M.III.2 : courbe d'étalonnage pour le dosage de la concentration en acides phénoliques totaux en mg équivalent d'acide gallique par mL. (Equation : $Abs_{725nm} = 5,85 \times$ mg d'acide gallique par mL + 0,02).

Réactifs : acétone (Carlo Erba), acide trichloroacétique pur (Labosi, 2895229), hydroxyde de sodium (Merck, B575798 003), acide chlorhydrique 37 % (Carlo Erba, 403872), acétate d'éthyle (Normapur, 88070), acide gallique 98 % (Acros Organics, A014986701), réactif de Folin-Denis (Fluka, 10883), carbonate de sodium (Prolabo, 92113).

Matériel : centrifugeuse (Jouan M14.11), extracteur rotatif (rotavapor Büchi), vortex (Top Mix, Bioblock), spectrophotomètre UV/Visible (Novaspec 4049, LKB Biochrom).

III.1.5. Teneur en acide phytique.

La détermination de la teneur en acide phytique est réalisée par la méthode de Wheeler et Ferrel (1971). Les phytates sont dosés indirectement grâce à leur capacité à fixer les ions Fe^{3+} : une molécule de phytate peut fixer quatre cations Fe^{3+}.

200 mg d'échantillon sont placés sous agitation en présence de 10 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 3 %, pendant 30 mn. Le TCA permet la libération des phytates pouvant se trouver associés aux protéines. Après une centrifugation (1900 trs/mn, 30 mn), le culot est écarté et 5 mL de surnageant sont prélevés, auxquels 2 mL de solution de $FeCl_3$ 0,02 mol/L sont ajoutés afin de fixer les ions Fe^{3+} sur l'acide phytique. Cette solution est mise à bouillir dans un bain-marie pendant 30 mn, et après avoir réalisé une nouvelle centrifugation, l'acide phytique est récupéré dans le culot. Le culot est lavé au TCA 3 % et à l'eau afin d'éliminer les ions Fe^{3+} en excès. 1,5 mL de NaOH 1,5 N sont ajoutés et le mélange est bouilli pendant 30 mn. Après refroidissement, le précipité de $Fe(OH)_3$ formé est centrifugé puis lavé à l'eau chaude par centrifugation. Le culot obtenu est dissous par 20 mL d'acide nitrique 3,2 N dans une fiole de 50 mL complétée avec de l'eau distillée. La réaction colorimétrique est effectuée avec 12,5 mL de l'échantillon et 10 mL de KSCN 1,5 M dans une fiole complétée à 50 mL avec de l'eau. Les ions SCN^- réagissent spécifiquement avec les ions Fe^{3+}.

La gamme étalon (figure M.III.3) est réalisée à partir d'une solution mère de $Fe(NO_3)_3$, 9 H_2O à 100 µg Fe^{3+}/mL. De l'eau distillée sert de témoin. La mesure de l'absorbance est effectuée à 420 nm dans la minute suivant la mise en présence des deux solutions.

Réactifs : acide trichloroacétique pur (Labosi, 2895229), Chlorure de fer III (Acros Organics, A015398301), hydroxyde de sodium (Merck, B575798 003), acide nitrique (Prolabo, 92113), thiocyanate de potassium (Acros Organics, A014710301), nitrate de fer III nonahydraté (Acros Organics, A015472001).

Matériel : centrifugeuse (Jouan M14.11), bain-marie (Polystat 33, Bioblock), spectrophotomètre UV/Visible (Novaspec 4049, LKB Biochrom).

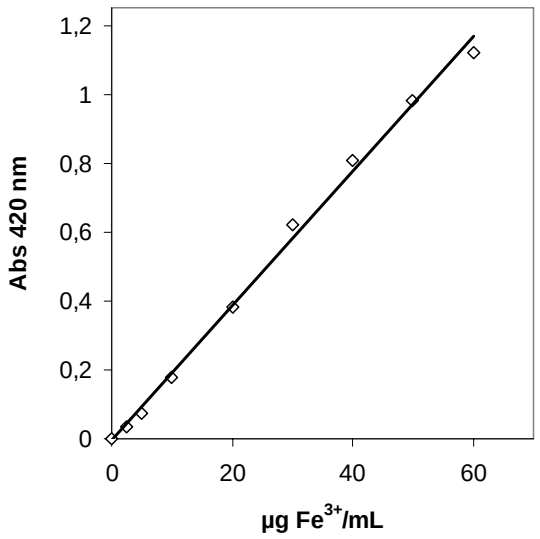


Figure M.III.3 : courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acide phytique. (Equation : Abs_{420nm} = 0,0195 × µg Fe^{3+} par mL – 0,0055).

III.1.6. Teneur en fibres et en sucres.

La teneur en fibres et en sucres est estimée en soustrayant les valeurs de la teneur des autres composés à 100 %.

III.2. COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA MATIERE PROTEIQUE.

III.2.1. Préparation des échantillons.

Une hydrolyse acide des protéines ou des peptides est préalablement effectuée pour obtenir un mélange homogène d'acides aminés libres. Un échantillon d'1 g ou d'1 mL est placé dans un tube à essais avec bouchon. 4 mL d'acide chlorhydrique 6 N sont ajoutés puis le tube à essais, fermé, est mis sous atmosphère d'azote. L'hydrolyse se fait ensuite dans une étuve à 110 °C pendant 24 h. Après refroidissement, les hydrolysats sont neutralisés jusqu'à un pH de 6 par ajout de soude 4 N. Les échantillons sont finalement filtrés sur filtre seringue à 0,22 µm.

L'inconvénient de l'hydrolyse acide est la destruction du tryptophane et la transformation de la glutamine et de l'asparagine, respectivement en acide glutamique et en acide aspartique. La proportion de tryptophane dans les protéines de colza est très limitée (Godon, 1996). En effet, cette dernière atteint seulement 0,5 % dans les globulines et les albumines ne possèdent pas de tryptophane (Simard *et al.*, 1977). C'est pourquoi, dans cette étude, cet acide aminé n'est pas analysé. Quant à la glutamine et l'asparagine, leur quantification est intégrée avec les acides aminés acides leur correspondant, sous les formes Glx et Asx (Glx = Gln + Glu et Asx = Asn + Asp).

Réactifs : hydroxyde de sodium (Merck, B575798 003), acide chlorhydrique 37 % (Carlo Erba, 403872).
Matériel : étuve (Memmert modèle 700), filtres à usage unique 0,22 µm (Schleicher & Schuell).

III.2.2. Protocole de dosage des acides aminés.

Les acides aminés sont dosés par chromatographie liquide en phase inverse après dérivation en présence d'o-phtahaldéhyde (OPA) et de 9-fluorénylméthyl chloroformate (FMOC). Le principe de la dérivation est le suivant ; les acides aminés primaires sont placés en présence d'OPA et d'acide 3-mercapto-propionique (3-MPA) pour donner des isoindoles hautement fluorescents et absorbant dans le domaine UV (338 nm) (Godel *et al.*, 1992). Selon le même principe, les acides aminés secondaires sont dérivés en présence de FMOC pour donner des dérivés hautement fluorescents et absorbant dans le domaine UV (262 nm). Le seuil de détection est de l'ordre de 100 pmoles.

Les échantillons sont dérivés automatiquement à l'aide d'un système chromatographique HP 1090 Hewlett Packard. 3 µL d'échantillon sont tout d'abord neutralisés avec 1,5 µL de NaOH 2 N pour obtenir une dérivation totale. Puis, le tout est mélangé à 6,0 µL de tampon borate 0,4 N, 2,5 µL de la solution d'OPA + 3-MPA (10 mg d'OPA et 10 mg de 3-MPA dans 1 mL de tampon borate 0,4 N à pH 10,5) et 2,5 µL de la solution de FMOC pendant 15 mn ; enfin, le tout est injecté au niveau de la colonne de séparation Hypersil C18. Le solvant d'élution est composé de 100 % de solution A, pendant 17 mn, puis de 40 % de solution A et 60 % de solution B pendant 1 mn et enfin de 100 % de solution B, pendant 7 mn. Les acides aminés sont séparés selon leur polarité ; les plus polaires apparaissent en début d'analyse et les moins polaires en fin d'analyse. En sortie de colonne, les acides aminés primaires sont détectés par un détecteur UV, à 338 nm, et les acides aminés secondaires sont détectés par un détecteur UV, à 262 nm. La durée totale de l'analyse est de 25 mn.

Avant l'analyse des échantillons, trois solutions, contenant 17 acides aminés aux concentrations de 0,25, 0,5 et 2,5 nM respectivement, sont dérivés et injectés sans neutralisation préalable avec du NaOH 2 N. Les profils obtenus servent, après intégration des pics, à établir une gamme étalon pour chaque acide aminé (système Hewlett Packard).

Réactifs : FMOC (OSI, A4 700.792, 2,5 mg dans l'acétonitrile), acétonitrile (Fluka, 23184), OPA (Fluka, 79760), 3-MPA (Sigma, M-6750), tampon borate 0,4 N pH 10,5 (Hewlett-Packard, 5061-3339), solution étalon de mélange d'acides aminés (Sigma, AA-S-18), NaOH 2 N (Fluka, 72071).

Solvants : solvant A [20 mM d'acétate de sodium, 3 H_2O (OSI, 27652.298), à 0,024 % (v/v) de triéthylamine (OSI, 28 745.296) et 0,5 % (v/v) de tétrahydrofurane (OSI, 28 556.293). Le mélange est ajusté à pH 7,2 avec de l'acide acétique (OSI, 20 104.298)], solvant B [20 % (v/v) d'un tampon d'acétate de sodium à 100 mM (OSI, 27 652.298) ajusté à pH 7,2 avec de l'acide acétique, 40 % (v/v) d'acétonitrile et 40 % (v/v) de méthanol (Prolabo, 20 865.322)].

Matériel : colonne Hypersil C18 (Interchim, H5 C18-20R), système de chromatographie (Hewlett Packard système HP 1090).

III.3. ELECTROPHORESE SUR GEL.

La taille moléculaire des protéines présentes dans les différents substrats est déterminée par électrophorèse SDS-PAGE dans des conditions non-réductrices et réductrices.

Le gel électrophorétique permettant la séparation est un gel polyacrylamide à 15 % qui est la concentration classiquement utilisée pour une séparation optimale des protéines dont la taille moléculaire est comprise entre 10 et 100 kDa environ. Dans un bécher de 50 mL, 5 mL de tampon Tris HCl 0,5 M de pH 8,8, 0,2 mL de SDS à 10 %, 12 mL d'une solution d'acrylamide/bisacrylamide (30/0,8), 100 µL de persulfate d'ammonium (APS) à 10 % (p/v), 10 µL de NNN'N'-tétraméthyl éthylènediamine (TEMED) et 2,7 mL d'eau distillée sont mélangés. La polymérisation de l'acrylamide et du bisacrylamide s'effectue par la présence de radicaux libres et est catalysée par le persulfate d'ammonium et le TEMED (le TEMED catalyse la décomposition des ions persulfates pour donner un radical libre). Le mélange est alors « coulé » dans le portoir (plaques de verre séparées par deux espaceurs). Un gel de concentration est préparé pour permettre aux échantillons de se positionner sur une même ligne dans le gel de migration. Dans un bécher, 2,5 mL de solution tampon Tris HCl 0,5 M de pH 6,8, 100 µL de SDS 10 %, 1,3 mL d'acrylamide/bisacrylamide (30/0,8), 50 µL d'APS (10 %), 10 µL de TEMED et 6,1 mL d'eau distillée, sont mélangés. Ce mélange est alors coulé sur le gel de migration une fois que ce dernier est polymérisé.

Les échantillons sont préparés à une concentration de 2 µg/mL dans une solution de dépôt contenant du bleu de bromophénol. Le bleu de bromophénol est un colorant ionisé qui permet de suivre l'électrophorèse. Le mélange est chauffé dans un bain-marie à 96 °C pendant 5 mn. Pour l'électrophorèse réalisée dans des conditions réductrices, du β-mercaptoéthanol à 5 % (v/v) est ajouté à un ratio de 1/5 (v/v) dans la solution de dépôt avant le chauffage.

Chaque échantillon, ainsi que des marqueurs de taille (respectivement 20 µL et 5 µL) sont déposés dans un des puits du gel d'électrophorèse, lui-même plongé dans une enceinte

thermostaté contenant le tampon d'électrophorèse. La migration est réalisée à intensité constante (25 mA) et pour une tension maximale fixée à 180 V.
La migration réalisée, le gel est placé durant 2 h dans une solution de bleu de coomassie, colorant qui se fixe sur les protéines, puis douze heures dans une solution de décoloration et deux heures dans une solution d'acide acétique 5 % pour fixer l'image.

Solutions : solution d'acrylamide/bisacrylamide 30/0,8 (250 mL d'une solution d'acrylamide à 40 %, 2,68 g de bisacrylamide), solution de bleu de coomassie (100 mL de Coomassie R250, 400 mL de méthanol, 75 mL d'acide acétique et 425 mL d'eau distillée), solution de décoloration (400 mL de méthanol, 75 mL d'acide acétique et 525 mL d'eau distillée), tampon d'électrophorèse 10X (30 g de trisma, 144 g de glycine et 10 g de SDS), solution de dépôt (1,2 mL de tampon tris HCl pH 6,8, 2 mL de SDS 10 %, 1 mL de glycérol, 1 µL de bleu de bromophénol et 4,8 mL d'eau distillée).
Réactifs : marqueurs de taille (MBI Fermentas, SM0431).

III.4. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE D'EXCLUSION DE TAILLE (CLHP-ET).

La distribution de taille moléculaire des peptides dans les différents hydrolysats ou les fractions solubles (pH 4,5) leur correspondant est déterminée après leur analyse par chromatographie liquide haute performance d'exclusion de taille (CLHP-ET).
La méthode utilisée est celle mise en œuvre par Schweizer (2002). La colonne utilisée est une Superdex Peptide HR 10/30 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) qui permet une séparation optimale pour des tailles moléculaires comprises entre 200 et 7000 Da mais dont la limite d'exclusion de taille est de 20000 Da. Le volume d'injection de l'échantillon est de 50 µL (concentration : 5, 10 ou 20 g/L). L'élution est réalisée en isocratique à 0,6 mL/mn avec un mélange d'eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique (60/40/0,1) filtré sous vide à 0,45 µm et dégazé à l'hélium (5 mL/mn). La séparation est réalisée à température ambiante (25 °C) pendant 45 mn. La détection des peptides est déterminée à 214 nm. Avant l'analyse, l'échantillon est filtré sur filtre seringue de 0,22 µm.
La colonne a été préalablement étalonnée avec des peptides de masse molaire connue (figure M.III.4). Deux droites ont été obtenues en traçant le logarithme de la masse molaire en fonction du temps de rétention. La détermination de la relation liant la masse molaire (MM) des molécules à leur temps de rétention sur la colonne a permis de définir la distribution de taille moléculaire des peptides contenus dans les différents hydrolysats ou fractions. Les chromatogrammes sont divisés en cinq fractions qui correspondent aux domaines de taille

moléculaire apparente suivants : supérieurs à 10 kDa, entre 3 et 10 kDa, entre 1 et 3 kDa, entre 0,5 et 1 kDa et inférieurs à 0,5 kDa. Le tableau M.III.1 présente la correspondance entre la taille moléculaire apparente de chaque fraction et le temps de rétention. La proportion de chaque fraction, exprimée en %, est calculée comme étant l'aire de la fraction considérée divisée par l'aire totale du chromatogramme.

La CLHP-ET est également utilisée, d'une part, pour estimer la proportion des globulines et des albumines présentes dans les préparations protéiques, et, d'autre part, pour caractériser la présence ou non de molécules de faible taille moléculaire (< 3000 Da) telles que les composés phénoliques et l'azote non-protéique. Les mesures ont été effectuées en utilisant les mêmes conditions chromatographiques que celles qui sont employées pour caractériser la distribution de taille moléculaire des hydrolysats. L'estimation de la proportion de globuline et d'albumine s'appuie sur le fait que la colonne Superdex Peptide HR 10/30 utilisée dans cette étude possède, d'après le fabricant, une limite d'exclusion de taille de 20 kDa. En conséquence, les albumines de taille moléculaire comprise entre 12,5 et 14,5 kDa sont séparées tandis que les globulines de haute masse molaire (≈ 300 kDa) ou leurs sous-unités de taille moléculaire supérieure à 23 kDa sont directement exclues (Schwenke *et al.*, 2000 ; Monsalve et Rodriguez, 1990). D'après la courbe d'étalonnage de la colonne, les préparations protéiques peuvent être divisées en quatre catégories selon leur temps de rétention, tr : les globulines, les albumines, les polypeptides et les petits peptides (tableau M.III.2).
En fixant la longueur d'onde de détection à 310 nm, qui correspond à la longueur d'onde d'absorption maximale de l'acide sinapique, l'acide phénolique majoritaire du tourteau de colza (Sakakibara *et al.*, 2003 ; Naczk *et al.*, 1992), il est possible de quantifier cet acide phénolique par une méthode chromatographique mise au point par Tessier (2004). Les acides phénoliques libres sont caractérisés par un temps de rétention compris entre 34 et 37 mn, les pics sortant à des temps de rétention inférieurs sont les acides phénoliques liés aux protéines. Une telle méthode permet de déceler la présence d'acide sinapique libre ou lié dans les différentes préparations protéiques.

Réactifs : acétonitrile (Merk, 114291), acide trifluoroacétique (Fluka, 91703)

Matériel : colonne d'exclusion de taille (Superdex Peptide HR 10/30, Amersham Biosciences), système de chromatographie liquide (BioCAD®, PerSeptive Biosystems), collecteur de fraction (modèle 203B, Gilson), filtres 0,45 µm (Minisart, Sartorius), dispositif de filtration sous vide, fritté en verre (Sartorius SM 16309, Sartorius), filtre seringue 0,22 µm (Millex, Millipore).

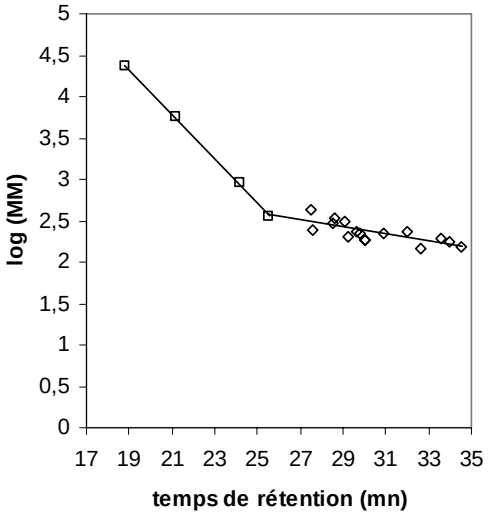


Figure M.III.4 : relation, obtenue par CLHP-ET (colonne Superdex Peptide HR 10/30, UV 214 nm, débit 0,6 mL/mn), reliant la masse molaire (MM) et le temps de rétention de protéines et de peptides étalons (Source : Schweizer, 2002).

Tableau M.III.1 : intervalles de tailles moléculaires et de temps de rétention correspondants.

Fraction de tailles moléculaires en kDa	Temps de rétention (mn)
> 10	< 20,2
3 – 10	20,2 – 22,1
1 – 3	22,1 – 23,9
< 1	> 23,9

Tableau M.III.2 : fraction azotée dans la MPV considérée, taille moléculaire et temps de rétention correspondants.

Fraction azotée	Taille moléculaire (kDa)	Temps de rétention (mn)
Globulines	> 23	< 18,8
Albumines	5,5 – 23	18,8 – 21,2
Polypeptides	0,5 – 5,5	21,2 – 25,1
Tri- et Dipeptides	< 0,5	> 25,1

III.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSE (CLHP-PI) COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE.

Les hydrolysats sont analysés par chromatographie en phase inverse (CLHP-PI) couplée à la spectrométrie de masse (SM) suivant la méthode mise en œuvre par Schweizer (2002).

Les mélanges peptidiques, filtrés à 0,22 µm avec un filtre seringue, sont séparés (injection de 10 µL à 20 g/L) sur un système CLHP équipé d'une colonne C_{18} Prosphere 300 Å (250 mm × 2,1 mm) et d'un détecteur UV. Les analyses sont réalisées à 35 °C. L'élution est réalisée à 0,2 mL/mn de 0 à 43 mn et à 0,3 mL/mn de 43 à 63 mn. Un gradient linéaire est appliqué pendant 43 mn de 100 % d'un mélange d'H_2O/ACN/TFA (95/5/0,5) (solvant A) à 50 % d'un mélange d'H_2O/ACN/TFA (5/95/0,05) (solvant B). Puis la colonne est rincée 5 mn avec 100 % de solvant B à 0,3 mL/mn afin d'éliminer les molécules adsorbées sur la matrice de la colonne. La colonne est ensuite restabilisée en 100 % de solvant A pendant 15 mn à 0,3 mL/mn. La détection des peptides est réalisée à 214 nm.

La distribution du caractère hydrophobe/hydrophile des peptides est déduite de la courbe de calibration de la colonne montrée en figure M.III.5 (Schweizer, 2002). Tout d'abord, le chromatogramme du solvant est soustrait à celui de l'échantillon. Comme montré dans le tableau M.III.3, les chromatogrammes sont ensuite divisés en quatre fractions suivant l'indice d'hydrophobie (IH) des peptides et donc suivant leur nature hydrophile/hydrophobe. La

proportion de chaque fraction, exprimée en %, est calculée comme étant l'aire de la fraction considérée divisée par l'aire totale du chromatogramme.

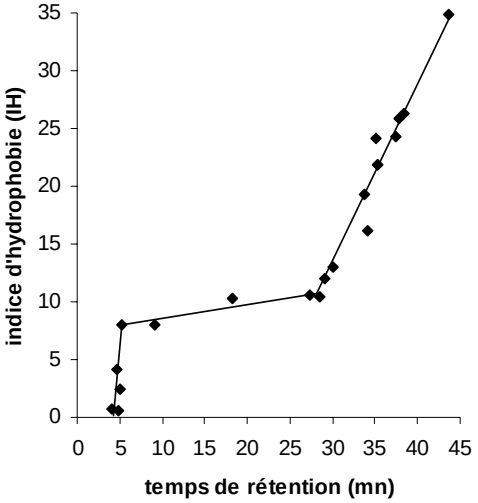


Figure III.5 : relation, obtenue par CLHP-PI, reliant l'indice d'hydrophobie et le temps de rétention de peptides étalons sur une colonne C_{18} Prosphere 300 Å, UV 214 nm. (Source : Schweizer, 2002).

Tableau M.III.3 : intervalles d'indice d'hydrophobie, nature hydrophile/hydrophobe et de temps de rétention correspondants.

Fraction d'indice d'hydrophobie	**Nature hydrophile / hydrophobe des peptides**	**Temps de rétention (mn)**
< 5	hydrophile	< 6
5 – 10,5	amphiphile	6 – 27,5
10,5 – 26	hydrophobe	27,5 – 37
> 26	très hydrophobe	37 – 48

Les peptides séparés par CLHP-PI sont directement analysés par spectrométrie de masse. Le spectromètre de masse est un SCIEX API 150EX simple quadripole avec une source d'ionisation du type ESI (electrospray ionisation). Toutes les analyses sont réalisées en mode d'ionisation positive. Les paramètres opératoires sont les suivants : gamme de balayage entre 100 et 1500 unités de masse (m/z), tension d'orifice de 60 V, durée du balayage de 1,4 s, taille du pas de 0,2 unité de masse (m/z), temps de réponse (dwell time) de 0,1 ms. Le logiciel Masschrom permet de traiter les données.

A partir des chromatogrammes CLHP-PI et des spectres de masse, les cartes peptidiques de chaque hydrolysat sont constituées. Pour cela, les spectres de masse sont analysés toutes les 10 s. Tous les pics de masse dont l'intensité est supérieure à 15000 coups par seconde (cps) sont sélectionnés (seuil arbitraire). Chaque pic est supposé correspondre à un peptide de masse MH^+. Leurs temps de rétention correspondant sont aussi notés. Les cartes peptidiques constituées sont alors comparées d'hydrolysat à hydrolysat. Deux peptides sont considérés similaires, d'une part, si leurs temps de rétention sont similaires à plus ou moins 0,5 mn et, d'autre part, si leurs masses MH^+ sont similaires à plus ou moins 0,6 unités de masse. Le pourcentage de similarité entre deux cartes peptidiques est défini par l'équation suivante :

$$\% \text{ de similarité} = 100 - \left(\frac{\text{Nombre de peptides similaires entre les deux cartes peptidiques}}{\text{Nombre total de peptides présents dans les deux cartes peptidiques}} \times 100 \right)$$

Réactifs : acétonitrile (Merk, 114291), acide trifluoroacétique (Fluka, 91703).

Matériel : colonne C18 Prosphere 300Å (Alltech, C6000B), système de chromatographie liquide (Perkin Elmer série 200, Perkin Elmer), détecteur UV (PE 785A, Perkin Elmer), spectromètre da masse (Sciex API 150EX, Applied Bisystems), filtre seringue (Millex, Millipore).

III.6. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES HYDROLYSATS.

III.6.1. Solubilité azotée des hydrolysats.

La solubilité azotée des hydrolysats a été déterminée à pH 4,5. Un pH de 4,5 a été choisi parce qu'il correspond au pI de l'isolat de globulines, c'est-à-dire au pH où les protéines sont initialement non solubles. Un aliquot de 10 mL de l'hydrolysat est prélevé et ajusté avec des solutions d'HCl à pH 4,5. La fraction soluble est séparée de la fraction insoluble par centrifugation à 6000 g pendant 10 mn à température ambiante. Le surnageant est filtré sur filtre seringue 0,22 µm. L'azote total (N × 6,25) de la fraction soluble est dosé par la méthode Kjeldahl. La solubilité à pH 4,5 est calculée par la formule suivante :

$$\text{Solubilité (\%)} = \frac{\text{Azote total dans la fraction soluble à pH 4,5 (g)}}{\text{Azote total dans l'hydrolysat (g)}} \times 100$$

Réactif : HCl (Carlo Erba, 403872). Matériel : pH-mètre (PHM 62, Radiometer), filtre seringue (Millex, Millipore), centrifugeuse (Sigma 302K, Sigma).

III.6.2. Capacité à retenir l'huile.

La capacité des hydrolysats à retenir l'huile est déterminée par la méthode de Vioque *et al.* (2000). 0,5 g d'hydrolysat est mélangé avec 5 mL d'huile de soja pendant 10 mn avec un agitateur magnétique. Le mélange est alors centrifugé à 2200 g pendant 30 mn à température ambiante. Le volume de surnageant est mesuré. La capacité de l'hydrolysat à retenir l'huile est définie comme étant le volume d'huile retenu, en mL, par 100 g d'hydrolysat.

Réactif : huile de soja (Sigma, 33H1127). Matériel : centrifugeuse (Jouan M14.11).

III.6.3. Capacité moussante et stabilité moussante.

Les méthodes décrites par Vioque *et al.* (2000) sont utilisées. 25 mL de l'hydrolysat à 1,5 % (p/v) sont homogénéisés à 8000 trs/mn pendant 5 mn à l'aide d'un ultraturax. Le mélange est immédiatement transféré dans un flacon gradué. La capacité moussante est définie comme étant le pourcentage du volume de mousse (mL) divisé par le volume total du mélange (mL). La stabilité moussante est définie comme étant le pourcentage de mousse restant après un temps donné : 5, 15, 30, 60 ou 120 mn, à température ambiante.

Matériel : homogénéisateur (Ultraturax T25 Janke & Kunkel, Labortechnik).

III.6.4. Activité émulsifiante et stabilité de l'émulsion.

L'activité émulsifiante de l'hydrolysat est déterminée par la méthode de Vioque *et al.* (2000). 20 mL de l'hydrolysat solubilisé à une concentration de 7 % (p/v) sont homogénéisés avec un ultraturax pendant 30 s à 8000 tr/mn. Puis 10 mL d'huile de soja sont ajoutés à la solution et le mélange est à nouveau homogénéisé 30 s à 8000 tr/mn. 25 mL d'huile de soja sont encore ajoutés et le mélange est homogénéisé pendant 90 s. Le mélange émulsifié est placé dans un tube de centrifugation préalablement gradué. La solution émulsifiée est alors centrifugée à 1100 g pendant 5 mn à température ambiante. L'activité émulsifiante est calculée comme étant le rapport du volume de la couche émulsifiée après centrifugation (mL) sur le volume de l'émulsion avant la centrifugation (mL).

La stabilité de l'émulsion est déterminée en utilisant les échantillons précédents. Ces derniers sont chauffés pendant 15 mn à 85 °C. Après leur refroidissement à température ambiante, ils subissent une nouvelle centrifugation à 1100 g pendant 5 mn. La stabilité de l'émulsion est déterminée comme étant le pourcentage de l'activité émulsifiante restante après l'étape de chauffage.

Réactif : huile de soja (Sigma, 33H1127). Matériel : homogénéisateur (Ultraturax T25 Janke & Kunkel, Labortechnik), bain-marie (Polystat 33, Bioblock), centrifugeuse (Jouan M14.11).

III.7. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES HYDROLYSATS SUR LA CROISSANCE DE CELLULES ANIMALES CULTIVEES DANS UN MILIEU SANS SERUM.

L'effet des fractions solubles des hydrolysats (appelés hydrolysats solubles), en tant qu'additif ou substitut dans les milieux de culture de cellules animales ne contenant pas de sérum de veau fœtal, est évalué sur la croissance de cellules animales.
Les cellules mammaliennes utilisées sont des cellules CHO C5 (Chinese Hamster Ovary C5), très employées dans l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines recombinantes. Elles sont cultivées dans un milieu de référence composé d'un milieu de base RPMI 1640, de TIB (albumine, insuline, transferrine et sélénium), de glutamine (2 mM) et de minéraux. Elles sont propagées dans des flacons de Roux, à 37 °C sous atmosphère contenant 5 % de CO_2. Cette lignée cellulaire est adaptée à la culture en suspension.

Afin de quantifier l'influence des hydrolysats solubles sur la croissance de cellules animales, ces dernières sont cultivées pendant 7 à 8 jours dans des plaques à 96 puits, chaque puit contenant 200 µL de milieu formulé, et les plaques sont placées dans un incubateur (37 °C, atmosphère humide, 5 % de CO_2). Les milieux formulés (de pH 7,4) sont composés du milieu de référence dans lequel est ajouté soit l'hydrolysat soluble afin d'obtenir une concentration finale de 2, 4 ou 6 g/L (concentration initiale de l'hydrolysat = 20 g/L, volume ajouté ≤ 60 µL), soit de l'eau (même volume que l'hydrolysat) afin de constituer un témoin. Deux types d'expériences sont conduites. Les premières expériences sont réalisées pour évaluer l'influence des hydrolysats en tant qu'additif. Les secondes sont conduites afin de déterminer l'influence des hydrolysats en tant que substitut à certains composants du milieu de référence tels que les protéines contenues dans les TIB (insuline, transferrine et albumine) ou les éléments traces (sels, métaux). Un hydrolysat de blé, l'hydrolysat HP4605 de chez Quest International, connu pour favoriser la croissance des cellules eucaryotes, est utilisé comme témoin positif.
Pour chaque hydrolysat évalué, la croissance des cellules est observée dans huit puits distincts. Chaque puit est ensemencé à une densité cellulaire d'environ $0,8 \times 10^5$ cellules/mL ; cette concentration permet de suivre une cinétique de croissance des cellules sur 120 h. En effet, celle-ci est suffisante pour éviter une phase de latence trop longue et, à l'inverse, elle est assez limitée pour ne pas atteindre une confluence du puit trop rapidement. La croissance des cellules est suivie, en quantifiant, par analyse d'images, le nombre de cellules totales dans chaque puit grâce au système Cellscreen (Innovatis AG, Allemagne). Le Cellscreen est un

système composé d'un objectif × 10, d'un système de photographie numérique et d'un analyseur d'images. Le nombre de cellules totales (sans discrimination des cellules mortes) est mesuré à la fréquence d'une analyse par jour, pendant 4 à 10 jours.

Ces expériences permettent ainsi de cribler les hydrolysats potentiellement actifs sur la croissance de cellules animales (Brinkmann *et al.*, 2002). Bien que les cinétiques soient étudiées dans un système statique, le Cellscreen présente l'intérêt d'être un système non invasif qui nécessite très peu de matériel. Grâce aux images numérisées, ce système permet aussi d'observer la morphologie des cellules.

Réactifs : RPMI 1640 (Sigma), TIB (5 g/L d'albumine bovine, 5mg/L d'insuline bovine, 5 mg/L de transferrine humaine, 1 mM de pyruvate de sodium, 0,1 µM de L-alanine, 1 µM de putrescine, 3 µM de sulfate de fer, 3 µM de sulfate de zinc, 10 nM de sulfate de cuivre et 10 nM de sélénite de sodium), hydrolysat de blé (HP4605, Quest International).

Matériel : Compteur de cellules par analyse d'images numériques (Cellscreen, Innovatis AG), plaque 96 puits (Nunc), étuve (Jouan).

I. PREPARATION D'ISOLATS PROTEIQUES ET D'HYDROLYSATS FONCTIONNELS A PARTIR DE TOURTEAUX DE COLZA.

I.1. INTRODUCTION.

La première partie de ce travail est consacrée à l'élimination des composés non-protéiques du tourteau de colza tels que les fibres, les lipides, l'acide phytique, les composés phénoliques, les minéraux, l'azote non-protéique afin de s'affranchir de certains de leurs effets potentiels visant à dégrader les propriétés d'intérêt des peptides ou à modifier le processus hydrolytique des protéases lors de la génération des peptides.

La phase préliminaire de cette étude a pour objectif de mettre en œuvre différents procédés d'obtention d'isolats protéiques à partir d'une farine de tourteaux industriels de colza et de les évaluer sur des critères technico-économiques tels que le rendement et la pureté protéiques du produit final, le coût et la faisabilité technique à l'échelle industrielle.

Dans une seconde phase, le procédé le plus satisfaisant sera optimisé. Pour cela, le suivi de la composition chimique des produits intermédiaires obtenus au cours du procédé et la caractérisation des protéines les constituant seront réalisés afin d'identifier le rôle de chaque étape sur la détoxification de la farine et de s'assurer une élimination satisfaisante des composés non-protéiques.

L'objectif de la troisième phase sera de caractériser et d'évaluer l'influence de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés fonctionnelles des isolats précédemment produits. Classiquement utilisée dans l'agroalimentaire pour améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines, l'Alcalase 2,4L sera la préparation commerciale d'enzymes retenue pour effectuer les hydrolyses.

I.2. EVALUATION DE DIVERS PROCEDES POUR L'ISOLEMENT DE PROTEINES DE COLZA.

Beaucoup de travaux ont été entrepris afin de détoxifier la farine de graines de colza ou celle de tourteaux. Suivant le degré de pureté recherché pour la matière protéique finale, plusieurs procédés ont été proposés. Ceux-ci diffèrent par leur complexité, leur coût et leur facilité d'extrapolation à l'échelle industrielle. En général, le procédé de base pour obtenir une solution enrichie en protéines consiste en une extraction de la farine en milieu alcalin (NaOH ou Na_2SO_4) ou salin (NaCl), suivie d'une étape de récupération des protéines solubilisées soit

par précipitation (au point isoélectrique des protéines ou par ajout d'agents précipitants), soit par la mise en œuvre de techniques membranaires (ultrafiltration, dialyse).
Quatre procédés, inspirés de la littérature, ont été développés. Ils ont en commun l'étape d'extraction des protéines de la farine avec de la soude 0,1 N. En effet, pour des concentrations comprises entre 0,02 et 0,2 N, la soude est reconnue pour être l'un des meilleurs solvants d'extraction des protéines de la farine de colza permettant une bonne solubilité des protéines, une absence de formation de lysino-alanine tout en limitant la destruction ou la racémisation des acides aminés. La durée de cette étape d'extraction a été fixée à 1 heure parce qu'aucun gain significatif du rendement de solubilisation de la matière protéique n'est obtenu avec des temps plus longs (Schweizer, 2002 ; Klockeman *et al.*, 1997). Dans un premier temps, le ratio farine/NaOH utilisé dans cette partie de l'étude est de 50 g/L. Cette valeur a été choisie car, d'après plusieurs travaux, les rendements d'extraction les plus importants ont été observés pour des ratios variant entre 25 et 100 g/L (El-Nockrashy *et al.*, 1977 ; Gonçalves *et al.*, 1997 ; Tzeng *et al.*, 1988).

Le procédé n° 1, constitué d'une extraction et d'une précipitation isoélectrique des protéines, est le procédé classiquement retrouvé pour la production d'isolats protéiques à partir de farines de colza. Dans le procédé n° 2, inspiré des travaux de Gonçalves *et al.* (1997) et de Lacroix *et al.* (1988), une pré-extraction de la farine est réalisée avec un mélange solvants organiques/eau (appelée étape de « dépolyphénolisation ») afin d'éliminer les polyphénols, les glucosinolates, les sucres solubles et les lipides polaires. Le procédé n° 3 s'inspire de quelques travaux portant sur l'utilisation de la dialyse pour concentrer les protéines extraites à partir de matières végétales (Folawiyo et Owusu Apenten, 1997 ; Schwenke *et al.*, 1981 ; Mohamad Ramlan *et al.*, 2002). La précipitation des protéines par adjonction de sel est la méthode de purification protéique utilisée dans le procédé n° 4. Elle fait intervenir le caractère plus ou moins hydrophobe des protéines. Le sel choisi dans ce travail est le sulfate d'ammonium, sel le plus communément employé (Tessier *et al.*, 1992).

Ces procédés de détoxification de la farine de tourteaux de colza, succinctement schématisés dans la figure I.1, ont été comparés, d'une part, en fonction de la pureté et du rendement protéiques des produits intermédiaires et du produit final, d'autre part, en fonction du type de protéines isolées, et enfin, suivant la composition en acides aminés des protéines.

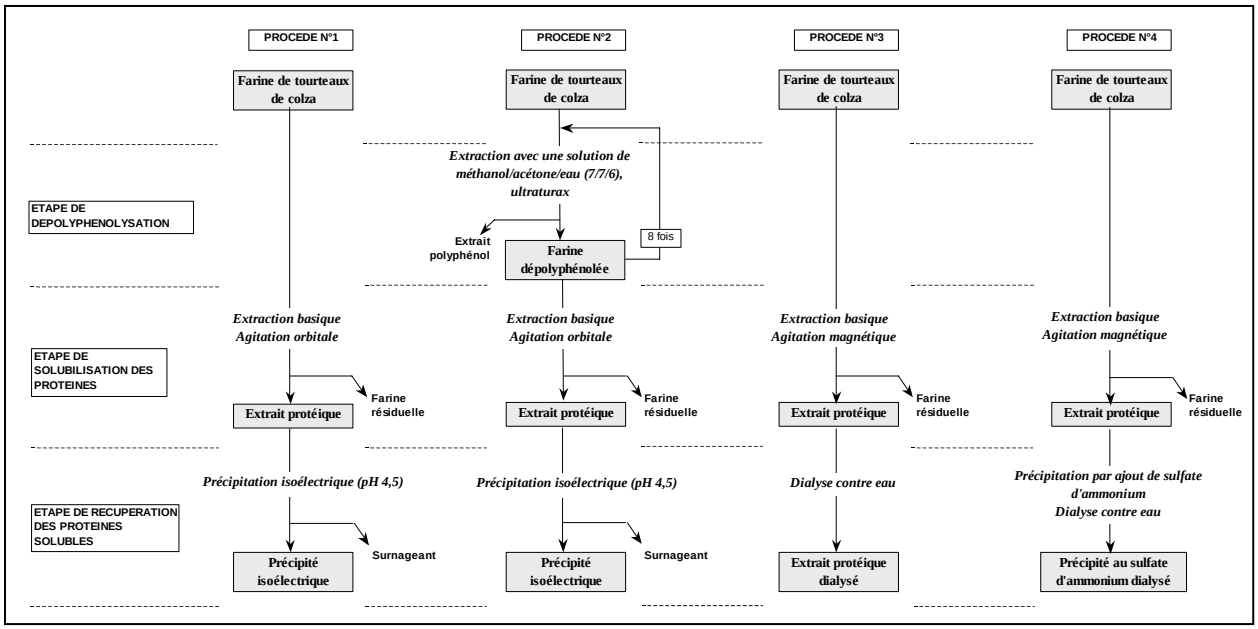


Figure I.1 : schéma synthétisant les différents procédés d'isolement étudiés dans ce travail.

I.2.1. Influence des procédés d'isolement sur la pureté et le rendement protéiques des produits intermédiaires et du produit final.

Le tableau I.1 présente le rendement protéique et la pureté protéique des produits intermédiaires et du produit final obtenus par les divers procédés.

Il apparaît, tout d'abord, que la farine de tourteaux industriels de colza est assez riche en protéines puisque sa teneur en protéines sur la base de la matière sèche est de 41,4 %. Cette valeur est comparable à celles classiquement retrouvées dans la littérature, c'est-à-dire entre 30 et 45 % (Rozan, 1997 ; Vioque *et al.*, 2000).

Le tableau I.1 montre que tous les procédés étudiés conduisent à la production de concentrats protéiques puisque les produits finaux présentent une pureté comprise entre 60 et 90 %. Cependant, les concentrats obtenus avec les procédés 2 et 4 se distinguent des deux autres par leur pureté protéique plus élevée, de l'ordre de 20 %. Le procédé 1 se différencie aussi des autres par sa faible capacité à récupérer les protéines. En effet, avec ce procédé classique extraction/précipitation, seulement 16 % des protéines initialement présentes dans la farine sont retrouvées dans le précipité isoélectrique alors que les autres procédés permettent d'atteindre un rendement protéique global de 26 – 29 %.

Tableau I.1 : puretés protéiques et rendements protéiques des produits obtenus à chaque étape des différents procédés étudiés.

	en protéines (%)	**Procédé n° 1**	**Procédé n° 2**	**Procédé n° 3**	**Procédé n° 4**
Farine de tourteaux de colza	Rendement	**100**	**100**	**100**	**100**
	Pureté	**41,4**	**41,4**	**41,4**	**41,4**
Etape de dépolyphénolisation	Rendement	–	**100,6 ± 1,2**	–	–
	Pureté	–	**56,6 ± 3,2**	–	–
Etape d'extraction des protéines	Rendement	**45,9** (35,9*)	**58,5** (44,0*)	**35,9***	**35,9***
	Pureté	**49,9** (41,0*)	**69,1** (60,4*)	**41,0***	**41,0***
Etape d'isolement des protéines solubles	Rendement	**16,0 ± 1,1**	**26,4 ± 3,2**	**27,6 ± 1,7**	**28,8 ± 2,0**
	Pureté	**72,2 ± 1,9**	**86,6 ± 0,9**	**73,3 ± 2,0**	**87,0 ± 2,3**
Couleur		**Brun foncé**	**Brun clair**	**Brun**	**Brun clair**

* : extraction avec un système d'agitation magnétique.

La comparaison entre les procédés 1 et 2 montre que l'étape de dépolyphénolisation de la farine permet d'améliorer significativement la pureté et le rendement protéiques du produit final. La pureté protéique élevée du précipité isoélectrique final obtenu par le procédé 2 (≈ 87 %) provient du fait que l'extrait protéique est plus riche en protéines que celui issu du procédé 1. L'étape de dépolyphénolisation permettrait d'éliminer partiellement certains composés solubles dans les milieux basiques (composés phénoliques, glucosinolates, azote non-protéique, lipides polaires). Cette étape permet aussi d'améliorer la solubilisation des protéines puisque les rendements protéiques sont plus importants. Deux effets peuvent expliquer ce fait. D'une part, l'utilisation d'un homogénéisateur (de type ultraturax) lors de l'étape de dépolyphénolisation permettrait de broyer les particules de la farine de façon très fine, induisant alors leur meilleure solubilisation lors de l'extraction en milieu basique. D'autre part, suite à l'élimination d'une partie des composés phénoliques et de l'acide phytique, la formation des complexes protéines/polyphénols ou protéines/acide phytique défavorable à la solubilisation des protéines lors de l'étape d'extraction serait limitée.

D'après le tableau I.1, le système d'agitation de type orbital permet de mieux solubiliser les protéines que celui de type magnétique. Les rendements et pureté protéiques sont respectivement augmentés de 28 – 32 % et de 15 – 22 %. Ces résultats sont en accord avec ceux de Klockeman *et al.* (1997). Cependant, quel que soit le système d'agitation, seulement 36 à 59 % des protéines de la farine sont extraites. Ces valeurs d'extraction expliquent, en partie, les faibles rendements protéiques finaux observés pour les concentrats. Cette mauvaise solubilisation des protéines, observée dans plusieurs travaux (Jensen *et al.*, 1995 ; Tzeng *et al.*, 1990), proviendrait de l'état fortement dénaturé des protéines qui restent alors insolubles

même dans des milieux alcalins. Cette insolubilisation des protéines est probablement liée au traitement thermique lors de l'extraction industrielle de l'huile des graines (Mohamad Ramlan, 2002 ; Jensen *et al.*, 1995).

Contrairement à la précipitation isoélectrique qui ne permet de récupérer qu'un tiers des protéines présentes dans l'extrait protéique (procédé n° 1), la dialyse de ce dernier (procédé n° 3) permet d'en récupérer au moins les trois quarts. En comparant les procédés n° 3 et n° 4, la précipitation des protéines, par ajout de sulfate d'ammonium avant la dialyse, permet d'augmenter la pureté protéique du dialysat d'environ 19 % (de 73 à 87 %) sans perte en protéines.

Chaque concentrat est caractérisé par une couleur brune plus ou moins intense associée à la présence plus ou moins importante de polyphénols (Naczk *et al.*, 1998 ; Godon, 1996). Les concentrats des procédés 2 et 4 sont les plus clairs suggérant une élimination partielle de ces derniers au cours de leur préparation.

I.2.2. Caractérisation des protéines par CLHP-ET.

Les protéines des différentes fractions protéiques obtenues au cours des procédés étudiés ont été analysées par CLHP-ET. Le profil de taille des protéines présentes dans les extraits protéiques et les concentrats est montré dans la figure I.2.

D'après la courbe d'étalonnage de la colonne d'exclusion de taille obtenue avec des protéines et des peptides synthétiques, il est possible de distinguer 5 classes de matière azotée : les globulines (300 - 350 kDa) ou les myrosinases (65 - 75 kDa) directement exclues de la colonne (tr ≈ 13,5 mn), les grosses protéines dont les sous-unités des globulines (supérieures à 22 kDa) ou les oléosines (≈ 20 kDa) éluées à des temps inférieurs à 18,8 mn, les albumines dont la taille moléculaire est comprise entre 12,5 et 14,5 kDa (tr ≈ 19,5 mn), les peptides inférieurs à 10 kDa entre 24 et 33 mn, et les acides aminés et autres petites molécules absorbant à 214 nm élués à des temps de rétention autour de 34,5 mn.

Les extraits protéiques issus des procédés 1, 3 et 4 seraient composés de l'ensemble des molécules azotées citées ci-dessus avec une prédominance pour les albumines (figure I.2).

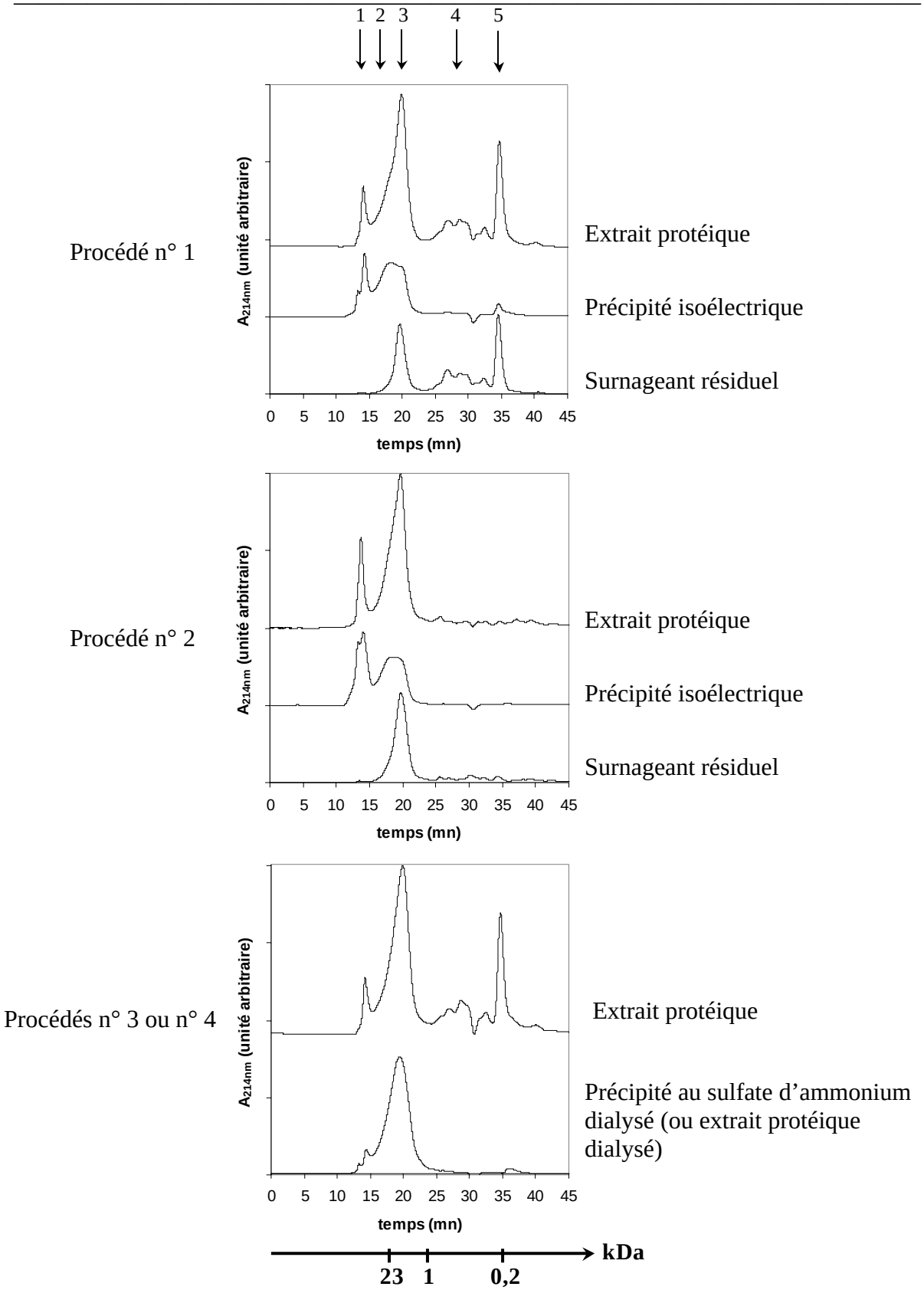


Figure I.2 : chromatogrammes d'exclusion de taille des extraits protéiques et concentrats obtenus lors des différents procédés étudiés. 1 : globulines et myrosinases, 2 : grosses protéines (sous-unités de globulines et oléosines), 3 : albumines, 4 : petits polypeptides, tri- et dipeptides, et 5 : acides aminés libres et autres peptides molécules. Système chromatographique : colonne Superdex Peptide H/R 10/30, détection : 214 nm, solvant : eau/ACN/TFA (60/40/0,1), débit : 0,6 mL/mn.

Lorsque la farine est dépolyphénolée (procédé 2), l'extrait protéique serait exempt de petits peptides, acides aminés libres et autres petites molécules non-protéiques. Comme montré par Schwenke (1994) et Liu *et al.* (1995), l'extraction de la farine avec des solvants hydroalcooliques permettrait d'éliminer la matière azotée non-protéique.

Les précipités isoélectriques (procédés 1 et 2) seraient principalement composés de globulines et de grosses protéines (environ 75 %) et d'albumines (environ 25 %). Le précipité isoélectrique issu du procédé 1 présenterait encore des petites molécules visualisées dans le chromatogramme par la présence d'un petit pic à 35 mn. Les surnageants résiduels des procédés 1 et 2 seraient principalement composés d'albumines. Celui obtenu à partir du procédé 1 se distinguerait de celui issu du procédé 2 par la forte proportion en petites molécules de nature peptidique et/ou non-protéique. Les albumines, qui ont un pI basique (≈ 9) resteraient solubles au pH isoélectrique des globulines. De nature hydrophile et chargée, ces dernières et les petits peptides ne précipiteraient pas.

Le précipité au sulfate d'ammonium et l'extrait dialysé (procédés 3 et 4) se distingueraient des précipités isoélectriques (procédés 1 et 2) par le fait qu'ils seraient principalement composés d'albumines et de grosses protéines (avec une proportion moindre en globulines). Il se caractériserait aussi par l'absence de petits peptides et autres molécules de taille moléculaire inférieure à 1000 Da. Lors de la dialyse, ces molécules ont probablement diffusé à travers la membrane de cellulose dont le seuil de coupure est de 12 kDa.

I.2.3. Composition en acides aminés des protéines présentes dans les concentrats.

La composition en acides aminés des protéines des différents concentrats est présentée dans le tableau I.2. Elle est relativement similaire d'un concentrat à l'autre et assez proche de celles retrouvées dans la littérature (Rozan *et al.*, 1997). Les concentrats sont riches en acides glutamique et aspartique et leur amides, ainsi qu'en arginine, ce qui est caractéristique des protéines de réserve (Godon, 1996). Toutefois, les proportions en méthionine et en lysine sont plus faibles que celles classiquement indiquées dans la littérature (Schwenke *et al.*, 1981). Ceci suggère un traitement thermique plutôt sévère au cours de la trituration des graines pour la production d'huile (Jensen *et al.*, 1995).

Par rapport aux recommandations de la FAO/WHO/UNO, les concentrats sont insatisfaisants en méthionine et en cystéine, particulièrement celui obtenu par le procédé classique

extraction/précipitation (procédé 1). Excepté cette dernière considération, la composition en acides aminés des concentrats est en adéquation avec celle recommandée par la FAO.

Le dialysat du précipité au sulfate d'ammonium se distinguerait des autres concentrats par une plus forte proportion en acide glutamique et glutamine. Ceci peut s'expliquer par une proportion albumine/globuline différente suivant le concentrat considéré. Les précipités isoélectriques des procédés 1 et 2 possèderaient une composition en acides aminés similaires à l'exception de quelques acides aminés tels que la tyrosine, la valine et la proline. Etant donné que leur proportion entre albumines et globulines est quasiment identique, les différences seraient plutôt liées à leur mode de préparation, et plus particulièrement à l'étape de dépolyphénolisation de la farine.

Tableau I.2 : composition en acides aminés des protéines présentes dans les diverses matières protéiques produites (% massique).

	MPV produites			**Farine de tourteaux de colza (Rozan et al., 1997)**	**Recommandation par la FAO/WHO/UNO**
Acide aminé (g / 100 g de protéines)	**Précipité isoélectrique du procédé n° 1**	**Précipité isoélectrique du procédé n° 2**	**Dialysat du procédé n° 4**		
Asx	9,2	11,3	9,3	7,1	–
Glx	19,4	19,7	24,3	16,5	–
Ser	3,9	3,1	3,9	4,2	–
His	3,7	3,7	3,7	3,7	1,9
Gly	5,1	5,1	4,6	5,5	–
Thr	4,5	4,6	4,5	4,5	3,4
Ala	3,8	3,8	3,8	3,8	–
Arg	11,1	9,8	8,4	6,4	–
Tyr	4,4	2,9	2,9	–	–
Cys	0,2	0,2	0,4	–	–
Val	8,8	5,4	6,2	4,6	3,5
Met	0,5 (0,7*)	1,2 (1,4*)	1,2 (1,6*)	5,2*	2,5*
Phe	3,9 (8,3**)	5,3 (8,2**)	4,0 (6,9**)	4,3**	6,3**
Ile	4,0	4,1	4,1	3,3	2,8
Leu	8,0	8,1	7,1	6,4	6,6
Lys	5,7	4,6	4,6	6,8	5,8
Pro	4,3	7,0	7,0	9,5	–
Trp	n.d.	n.d.	n.d.	0,9	–

* : Met + Cys ; ** : Phe + Tyr ; n.d. : non déterminé.

I.2.4. Récapitulatif de la préparation de concentrats par différents procédés.

Les différents procédés mis en œuvre ont permis d'obtenir des concentrats protéiques mais avec des rendements en protéines relativement faibles. Les concentrats protéiques produits sont équilibrés en acides aminés. Les procédés mettant en œuvre une précipitation isoélectrique (procédés 1 et 2) permettent de produire des concentrats riches en globulines et

en grosses protéines tandis que ceux mettant en œuvre une étape de dialyse (procédés 3 et 4) sont principalement composés d'albumines et de grosses protéines.
Toutefois, les procédés les plus performants en terme de pureté et de rendement protéiques sont les procédés mettant en œuvre soit une pré-étape d'extraction de la farine avec un solvant hydroalcoolique (procédé 2), soit une précipitation des protéines par ajout de sels suivie d'une dialyse (procédé 4). Ce dernier nécessite cependant une quantité élevée de sulfate d'ammonium non recyclable, ce qui le rend coûteux. En ce qui concerne le procédé n° 2, l'étape de dépolyphénolisation de la farine nécessite l'utilisation de solvant, impliquant également un coût important mais elle présente l'avantage d'être extrapolable à l'échelle pilote (Kozlowska et Zadernowski, 1983). De plus, dans un tel procédé, le recyclage de l'alcool est envisageable. C'est pourquoi, le procédé n° 2 a finalement été choisi comme protocole de base pour la détoxification de la farine et la purification des protéines de cette dernière.

Cependant, afin de rendre le procédé moins dangereux et plus viable économiquement, nous avons décidé de changer de solvant hydroalcoolique en optant pour un mélange éthanol/eau. En effet, autorisé comme solvant d'extraction dans la fabrication d'ingrédients alimentaires à partir de matières végétales (directive du conseil CEE, 1988), celui-ci est moins coûteux, plus facile à recycler par distillation et moins toxique que le mélange méthanol/acétone/eau. Il nous est également apparu plus économique de réduire le nombre d'extractions successives de la farine.

I.3. PREPARATION D'ISOLATS PROTEIQUES.

A partir des considérations précédentes, une étude a été conduite afin d'obtenir un isolat protéique (pureté ≥ 90 %) plutôt qu'un concentrat protéique tout en essayant d'améliorer le rendement protéique.
Pour cela, le procédé n° 2 précédent a été amélioré en étudiant, tout d'abord, l'influence du ratio éthanol/eau (v/v) lors de l'étape de dépolyphénolisation de la farine et du ratio farine dépolyphénolée/solvant basique (p/v) lors de l'étape d'extraction des protéines. Dans un deuxième temps, la mise en œuvre de la dialyse sur le précipité isoélectrique et de procédés de récupération des protéines restantes dans les fractions résiduelles comme la farine résiduelle (après extraction basique) ou le surnageant résiduel (après précipitation isoélectrique) a également été étudiée. La figure I.3 présente un schéma général du procédé étudié.

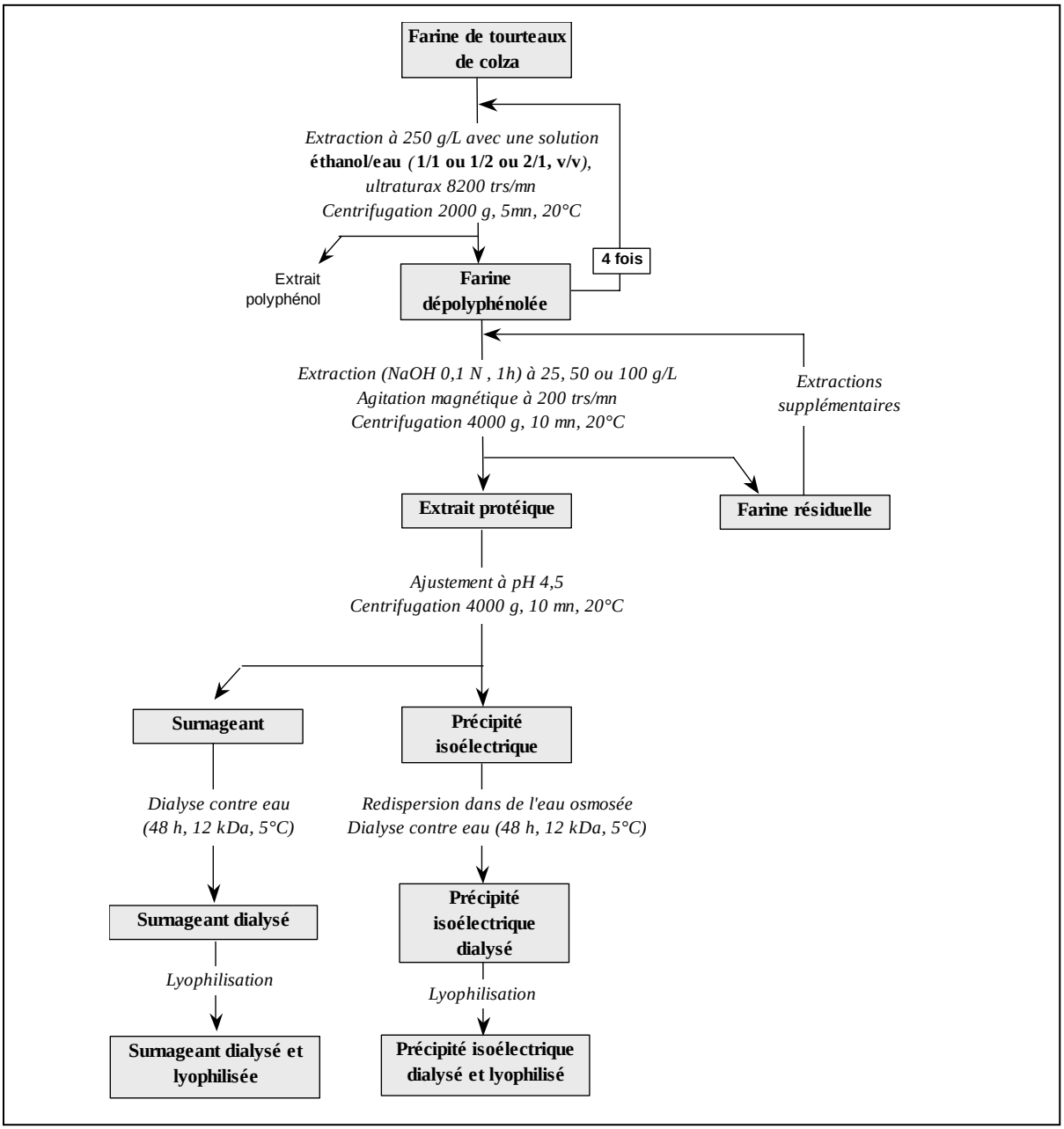


Figure I.3 : procédés étudiés pour l'obtention d'isolats protéiques à partir de farine de tourteaux de colza.

Afin de s'assurer d'une élimination satisfaisante des composés antinutritionnels et de mieux comprendre l'impact de chaque étape du procédé sur la détoxification de la farine, la composition chimique globale de certains produits intermédiaires obtenus au cours du procédé a été déterminée. Cette étude inclut aussi la caractérisation des protéines présentes dans les matières protéiques finales par CLHP-ET et par gel électrophorétique SDS-PAGE. Enfin, afin de vérifier la nécessité de l'étape de dépolyphénolisation de la farine, les expériences précédentes ont également été réalisées avec la farine originelle (non dépolyphénolée).

I.3.1. Elimination des polyphénols de la farine avec un solvant éthanol/eau.

La première phase de cette étude a été de déterminer le ratio éthanol/eau le plus approprié pour la dépolyphénolisation de la farine. D'après le tableau I.3, plus ce ratio augmente, plus la pureté protéique de la farine augmente et plus les pertes en protéines sont faibles. Certains travaux (Bérot *et al.*, 1983) ont également montré que les concentrations les plus élevées en éthanol sont les plus appropriées pour l'élimination des polyphénols de la farine de colza. C'est pourquoi, nous avons choisi le ratio 2:1. Lorsque la farine est extraite 4 fois successivement avec ce mélange, la farine obtenue possède une pureté protéique de l'ordre de 48 % avec une perte en protéines inférieure à 10 % (tableau I.3). Ces valeurs sont inférieures à celles trouvées lorsque la farine est extraite 8 fois avec un mélange méthanol/acétone/eau, mais elles demeurent satisfaisantes.

Tableau I.3 : extraction de la farine avec un mélange éthanol/eau. Influence du ratio volumique éthanol/eau et du nombre d'extractions successives de la farine.

	Pureté protéique (%)	**Rendement protéique (%)**
Farine de tourteaux de colza	41,4	100
Farine extraite 1 fois avec un mélange éthanol/eau (2:1, v/v)	43,9 ± 2,1	95,0 ± 3,7
Farine extraite 1 fois avec un mélange éthanol/eau (1:1, v/v)	41,2 ± 0,1	88,4 ± 1,5
Farine extraite 1 fois avec un mélange éthanol/eau (1:2, v/v)	40,2 ± 0,6	86,4 ± 2,4
Farine extraite 4 fois avec un mélange éthanol/eau (2:1, v/v)	47,8 ± 0,8	91,2 ± 3,0
Farine extraite 8 fois avec un mélange méthanol/acétone/eau (7:7:6, v/v/v)	56,6 ± 3,2	100,6 ± 1,2

La composition chimique des farines est présentée dans le tableau I.4. La farine de tourteaux a une composition chimique semblable à celle trouvée par Rozan (1997) ou Vioque *et al.* (2000). L'étape de dépolyphénolisation permet d'éliminer 50 % des lipides, 30 % des fibres ou des sucres solubles et 75 % des composés phénoliques de la farine. De tels résultats concordent avec ceux trouvés par Bérot *et al.* (1983). Finalement, par rapport à la farine originelle, la farine dépolyphénolée est caractérisée par une teneur en protéines plus importante (48 % contre 41 %) et par une teneur plus faible en lipides (2,1 % contre 3,2 %), en composés phénoliques (0,4 % contre 1,3 %) et en fibres (40 % contre 45 %).

Les principaux composés phénoliques extraits de la farine sont les acides et non les tanins. Les composés phénoliques non solubilisés dans le mélange hydroalcoolique (extrait «polyphénol») sont certainement ceux qui sont liés aux protéines par liaisons covalentes, hydrophobes, ioniques ou hydrogènes. De plus, cette étape ne permet pas d'éliminer l'acide phytique, d'où une légère augmentation de leur teneur dans la farine dépolyphénolée (teneur de 1,4 %).

Tableau I.4 : composition chimique de la farine, de la farine dépolyphénolée par quatre extraction successives avec un mélange éthanol/eau (2:1, v/v) et de l'extrait polyphénol.

	Teneur en % (base de la matière sèche)		**Quantité en g à partir de 100 g de farine de tourteaux**		
Fraction	Farine de tourteaux	Farine dépolyphénolée	Farine de tourteaux	Farine dépolyphénolée	Extrait polyphénol
protéines	41,4	47,8	37,8	34,5	1,7
lipides	3,25	2,1	3,0	1,5	1,4
cendres	7,6	8,6	6,9	6,2	0,3
composés phénoliques totaux (*)	1,25	0,4	1,2	0,3	0,8
tanins (*)	0,1	0,1	0,09	0,07	0,02
acides phénoliques (**)	0,3	0,09	0,27	0,06	0,16
acides phytiques	1,2	1,4	1,1	1,0	0,0
fibres + sucres solubles	45,3	39,6	41,3	28,5	14,3

Humidité : farine de tourteaux = 8,7 % et farine dépolyphénolée = 70,5 %. (*) : méthode de Makkar *et al.* (1993), (**) : méthode de Xu et Diosady (1997).

I.3.2. Extraction basique et précipitation isoélectrique.

I.3.2.1. Influence du ratio farine (solvant (p/v) sur l'extraction basique.

L'effet du ratio masse sèche de farine (dépolyphénolée ou non) / volume de soude sur le rendement global et la pureté des extraits protéiques a été étudié. La figure I.4 indique qu'à un ratio farine/solvant donné, les extraits protéiques issus d'une farine dépolyphénolée sont caractérisés par une meilleure pureté (50-75 %) que ceux issus d'une farine non traitée (30-45 %). Toutefois, la dépolyphénolisation de la farine ne permet pas d'améliorer significativement le rendement d'extraction. Ces résultats suggèrent que l'étape de dépolyphénolisation permet d'éliminer de la farine une partie des molécules non-protéiques qui ont la propriété d'être solubles dans la soude.

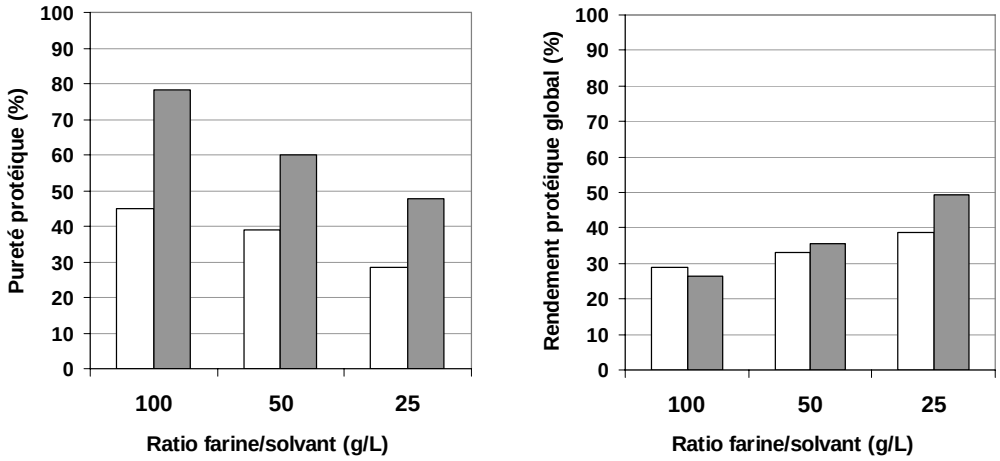


Figure I.4 : influence du ratio farine/solvant (g/L) sur la pureté protéique et le rendement protéique global des extraits protéiques issus d'une farine originelle (□) ou d'une farine dépolyphénolée (■).

La figure I.4 montre également que, pour les deux types de farine utilisés, une augmentation du ratio farine/solvant permet d'améliorer la pureté protéique mais induit, en contre partie, une diminution du rendement d'extraction. Des résultats similaires ont également été observés par Gonçalves *et al.* (1997). Une augmentation du ratio farine/solvant défavoriserait la solubilisation des protéines. L'augmentation de la pureté protéique par augmentation du ratio farine solvant pourrait s'expliquer par le rapport entre la quantité de sel ajouté et la quantité de protéines solubilisées.

Enfin, il apparaît aussi que les rendements d'extraction sont faibles puisque la meilleure valeur obtenue ne dépasse pas 50 %. Ceci proviendrait de l'état dénaturé des protéines du tourteau.

I.3.2.2. Précipitation isoélectrique des extraits protéiques.

Avant de réaliser l'étape de précipitation isoélectrique des protéines, nous avons déterminé le point isoélectrique de celles solubilisées à partir d'une farine dépolyphénolée. D'après la figure I.5, qui présente le profil de solubilité des protéines en fonction du pH, leur minimum de solubilité se situe entre pH 4 et pH 4,5, valeur également trouvée pour les protéines extraites à partir de la farine non traitée (Schweizer, 2002). Cette valeur de point isoélectrique est assez similaire à celles trouvées dans d'autres travaux : pH 5 d'après Vioque *et al.* (1999, 2000), pH 4,7 d'après Blaicher *et al.* (1983) mais aussi pH 3,5 d'après Chen *et al.* (1990). Notons que la présence d'un unique point isoélectrique facilite considérablement la récupération des protéines. En effet, certains travaux ont mis en évidence la présence de plusieurs minimum de solubilité impliquant un procédé à plusieurs étapes de précipitation (El-Nockrashy *et al.*, 1977).

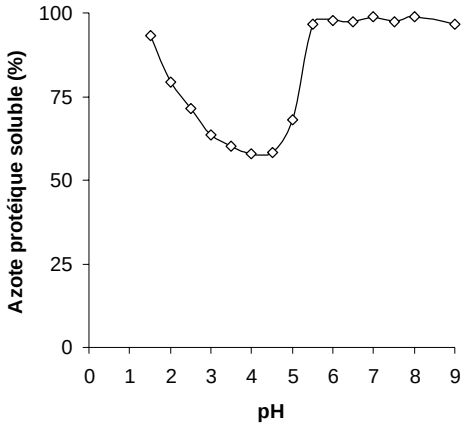


Figure I.5 : profil de solubilité de la matière protéique d'un extrait protéique issu d'une farine dépolyphénolée en fonction du pH.

La figure I.6 présente l'effet du ratio farine/soude (p/v) lors de l'extraction de la farine sur le rendement global et la pureté des précipités isoélectriques. Il apparaît que le ratio d'extraction et le type de farine utilisés n'influencent pas significativement le rendement protéique final des précipités isoélectriques. Ce dernier est de l'ordre de 18 %, ce qui est très faible. Toutefois, cette valeur est assez similaire à celle trouvée par Tzeng *et al.* (1990) qui ont réalisé un procédé quasiment identique (extraction basique + précipitation isoélectrique).

Lorsque le rendement protéique de l'étape de précipitation est calculé (tableau I.5), il est observé que plus le ratio farine/solvant augmente, plus ce rendement est élevé. Il évolue d'environ 40 % à 25 g/L à 60 % à 100 g/L. Ainsi, la diminution du ratio farine solvant améliore la solubilisation des protéines mais induit, en contre partie, une diminution du rendement de précipitation des protéines. Une augmentation du volume de soude pourrait défavoriser le phénomène d'agrégation des protéines ou, encore, induire la formation d'agrégats plus petits qui précipiteraient plus lentement.

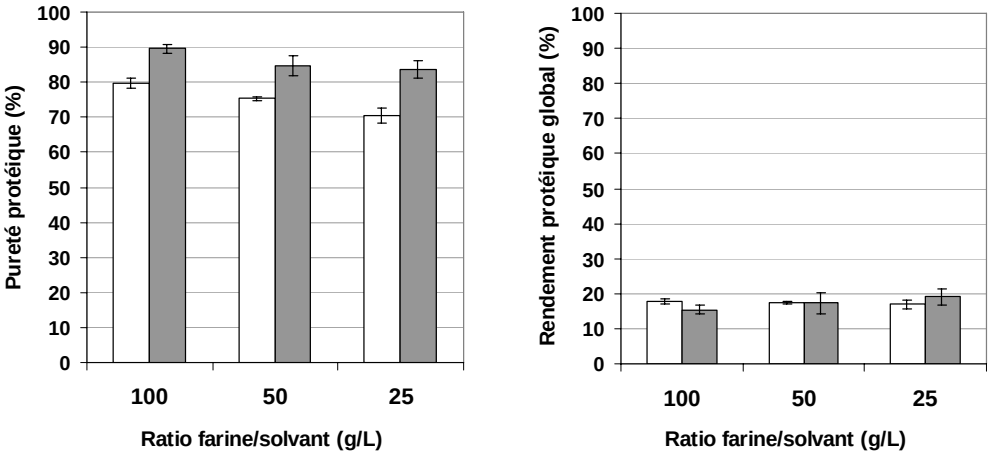


Figure I.6 : influence du ratio farine/solvant (g/L) lors de l'étape d'extraction sur la pureté protéique et le rendement protéique global des précipités isoélectriques. Farine originelle (□), farine dépolyphénolée (■).

Tableau I.5 : rendements protéiques de l'étape de précipitation entre les extraits protéiques et les précipités isoélectriques.

Ratio farine/solvant (g/L)	A partir d'une farine non traitée	A partir d'une farine dépolyphénolée
25	44,0	38,0
50	52,7	48,7
100	61,5	58,1

La figure I.6 montre également que le ratio farine/solvant, lors de l'étape d'extraction des protéines, influence légèrement la pureté des précipités isoélectriques. En effet, plus ce ratio

augmente, plus la pureté protéique semble augmenter. De 25 à 100 g/L, cette dernière passe de 70 à 80 % pour la farine non traitée et de 80 à 90 % pour la farine dépolyphénolée.
De plus, il est observé qu'à un ratio donné, la dépolyphénolisation de la farine permet d'augmenter la pureté protéique des précipités isoélectriques d'environ 10 points.

I.3.2.3. Dialyse des précipités isoélectriques.

Afin d'améliorer la pureté qui ne dépassait pas 90 %, nous avons procédé à la dialyse des différents précipités isoélectriques préalablement ressolubilisés dans de l'eau osmosée.
La dialyse permet d'augmenter la pureté protéique des précipités isoélectriques de l'ordre de 16 % pour ceux obtenus à partir de la farine non traitée (passant de 70-75 % à 82-86 %) et de l'ordre de 8 % pour ceux issus de la farine dépolyphénolée (passant de 84-85 % à 91-92 %) (tableau I.6). Ainsi, les précipités isoélectriques issus d'une farine dépolyphénolée et dialysés sont des isolats protéiques (pureté protéique ≥ 90 %).
La dialyse provoque aussi une très légère perte en protéines caractérisée par une diminution du rendement protéique final de l'ordre de 0,5 %.

Tableau I.6 : influence de la dialyse sur la pureté protéique des précipités isoélectriques.

Pureté protéique (%)	**A partir de farine non traité**		**A partir de farine dépolyphénolée**	
Ratio farine/solvant (g/L)	**25**	**50**	**25**	**50**
Précipité isoélectrique	70,4 ± 1,4	75,3 ± 0,1	83,6 ± 2,4	84,7 ± 3,0
Précipité isoélectrique dialysé	82,7 ± 1,6	86,0 ± 3,3	90,7 ± 1,3	91,8 ± 1,0

Cette étude a permis de montrer que le ratio farine/solvant est un paramètre qui n'influence pas ou très peu le rendement et la pureté du produit protéique final. C'est pourquoi, un ratio de 50 g/L a été choisi lors de la préparation des isolats protéiques.

I.3.2.4. Caractérisation des précipités isoélectriques.

La composition chimique des divers précipités isoélectriques est présentée dans le tableau I.7. Le précipité issu de la farine non traitée est caractérisé par des teneurs élevées en lipides (11,7 %), en composés phénoliques (3,3 %) et en acide phytique (3,1 %). Le précipité obtenu à partir d'une farine dépolyphénolée possède également des teneurs élevées en lipides (9,2 %) et en acide phytique (2,0 %) mais il est quasi-exempt de composés phénoliques (0,4 %).

Enfin, la dialyse de ce dernier permet de générer un isolat protéique sans acide phytique, avec très peu de composés phénoliques (0,2 %), et moins riche en lipides (6,6 %) et en sels (0,8 %). Ainsi, la composition chimique des divers précipités isoélectriques montre que la dépolyphénolisation de la farine permet, finalement, d'éliminer les composés phénoliques (90 %), une partie des lipides (30 %) et des fibres (50 %) alors que la dialyse permet d'éliminer principalement les sels et l'acide phytique. Suite à la formation de complexes ternaires acide phytique – cation – protéine, l'acide phytique ne serait pas éliminé à pH basique et se retrouverait dans le précipité isolélectrique. Lors de la dialyse, qui s'effectue à un pH légèrement acide (pH ≈ 6), l'acide phytique se retrouverait sous forme libre permettant alors son passage à travers la membrane de cellulose.

Tableau I.7 : composition chimique de précipités isoélectriques issus de la farine ou de la farine dépolyphénolée.

	Teneur en % (sur la base de la matière sèche)			**Quantité en g à partir de 100 g de farine de tourteaux**		
Précipité isoélectrique	**A partir de farine de tourteaux**	**A partir de farine dépolyphénolée**	**A partir de farine dépolyphénolée + dialyse**	**A partir de farine de tourteaux**	**A partir de farine dépolyphénolée**	**A partir de farine dépolyphénolée + dialyse**
protéines	73,6	85,6	91,4	6,0	6,7	6,4
lipides	11,7	9,2	6,6	1,0	0,7	0,5
cendres	3,1	2,8	0,8	0,3	0,2	0,05
phénols totaux (*)	3,3	0,4	0,2	0,3	0,0	0,0
tanins (*)	0,1	0,05	0,05	0,1	0,0	0,0
acides phénoliques (**)	0,5	0,1	n.d.	0,05	0,0	n.d.
acides phytiques	3,1	2,0	0,0	0,3	0,2	0,0
fibres + sucres solubles	5,2	2,0	1,0	0,4	0,2	0,1

(*) : méthode de Makkar *et al.* (1993), (**) : méthode de Xu et Diosady (1997). n.d. : non déterminé.

Le type de polyphénols, libres ou liés, est caractérisé par CLHP d'exclusion de taille à 310 nm (figure I.7). Tous les précipités isoélectriques contiennent des composés phénoliques liés. Ces phénols seraient complexés à tous types de protéines. Inversement, les acides phénoliques libres, encore présents dans le précipité issu de la farine non traitée, sont partiellement ou totalement éliminés par les étapes de dépolyphénolisation et/ou de dialyse.

Le type de protéines des différents précipités isoélectriques a été caractérisé par CLHP-ET. Les profils chromatographiques obtenus (figure I.8) diffèrent peu les uns des autres suggérant une faible incidence des étapes de dépolyphénolisation de la farine et de dialyse du précipité sur la composition en protéines du produit final. En particulier, la dialyse ne provoquerait pas de perte significative en albumines qui, de par leur petite taille, sont les protéines les plus susceptibles de traverser la membrane.

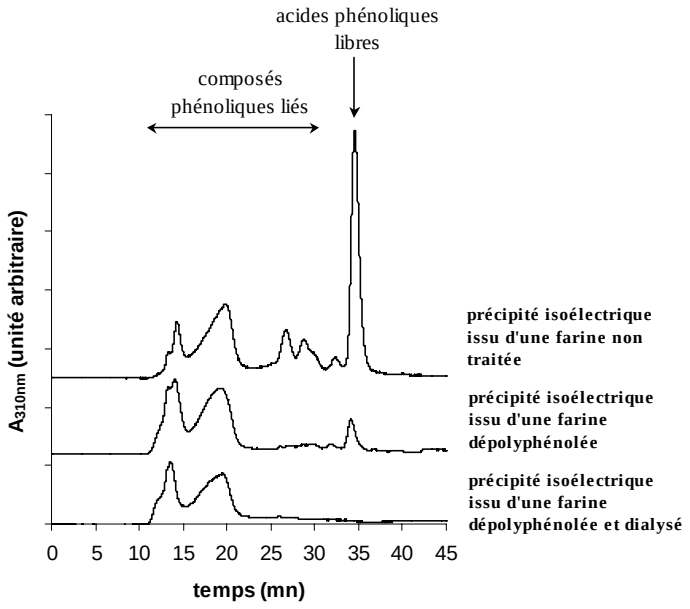


Figure I.7 : détermination par chromatographie d'exclusion de taille du type de composés phénoliques, libres ou liés, présents dans les précipités isoélectriques. Système chromatographique : colonne Superdex Peptide H/R 10/30, détection : 310 nm, solvant : eau/ACN/TFA (60/40/0,1), débit : 0,6 mL/mn.

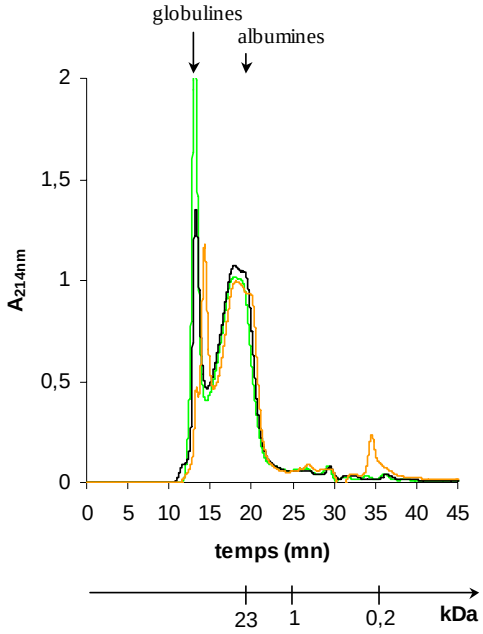


Figure I.8 : chromatogrammes d'exclusion de taille des précipités isoélectriques : (—) obtenu à partir d'une farine non traitée, (—) obtenu à partir d'une farine dépolyphénolée, (—) issu d'une farine dépolyphénolé et dialysé. Système chromatographique : colonne Superdex Peptide H/R 10/30, détection : 214 nm, solvant : eau/ACN/TFA (60/40/0,1), débit : 0,6 mL/mn.

L'analyse par CLHP-ET a permis d'estimer la proportion des globulines et des albumines des préparations protéiques. Les globulines et les protéines de taille moléculaire supérieure à 23 kDa constitueraient environ 70 % de la matière protéique tandis que les napines n'en représenteraient qu'environ 30 %.

Lors de cette étude, nous avons élaboré un procédé qui nous a permis de produire un isolat protéique essentiellement composé de globulines et de grosses protéines. Cependant, le faible rendement protéique du procédé (≈ 18 %) peut être amélioré par une procédure de récupération des protéines présentes dans les fractions résiduelles, c'est-à-dire la farine résiduelle et le surnageant résiduel.

I.3.3. Récupération des protéines des fractions résiduelles.

I.3.3.1. Purification des protéines présentes dans la farine résiduelle.

Suivant le ratio farine/solvant utilisé, la farine résiduelle obtenue après l'étape d'extraction des protéines comprend entre 45 et 65 % de protéines. C'est pourquoi, nous avons réalisé une seconde extraction de la farine soit avec de la soude 0,1 N suivant le même protocole opératoire que la première, soit avec une solution de NaCl 5 % (ratio farine/solvant = 55 g/L). Le tableau I.8 présente les caractéristiques azotées des différents extraits protéiques obtenus. Cette deuxième extraction de la farine, selon la solution utilisée, permet de récupérer moins de 12 % des protéines. De même, seulement 4 % des protéines initialement présentes dans la farine sont extraites lors d'une troisième extraction basique. Mais, la pureté protéique des extraits protéiques est faible (entre 18 et 30 %), ce qui peut poser des problèmes de purification par la suite. Ainsi, ces résultats mettent en évidence que la mise en œuvre d'extractions successives de la farine résiduelle n'est pas satisfaisante.

Tableau I.8 : extractions supplémentaires de la farine résiduelle. Pour les extractions basiques : ratio farine/soude = 25 g/L ; pour l'extraction saline : ratio farine/NaCl 5% = 55 g/L. n.d. : non déterminé.

	1ière extraction basique	2ième extraction basique	3ième extraction basique	2ième extraction saline
Rendement protéique global (%)	47	12	4	4
Pureté protéique (%)	49	30	18	n.d.

I.3.3.2. Purification des protéines présentes dans le surnageant résiduel.

** Dialyse du surnageant résiduel.*

Suivant le ratio farine/solvant lors de l'étape de solubilisation (25 ou 50 g/L), les surnageants résiduels contiennent entre 15 et 21 % des protéines initialement présentes dans la farine. Ces fractions ne sont pas pures puisque leurs teneurs protéiques varient entre 29 et 42 %. Tzeng *et al.* (1990) et Xu et Diosady (1994) ont déjà étudié la purification, par des techniques d'ultrafiltration et de diafiltration, des protéines restées solubles après précipitation isoélectrique. Dans notre étude, nous avons opté pour une technique membranaire plus classique : la dialyse.

Le tableau I.9 présente l'effet de la dialyse (seuil de coupure de 12 kDa) sur la purification d'un surnageant résiduel issu d'une farine dépolyphénolée. Les résultats montrent une excellente purification de la matière protéique mais ils montrent aussi une perte de la matière

azotée de l'ordre de 35 %. Ceci pourrait provenir du passage d'une partie des napines et de l'azote non protéique à travers la membrane de dialyse.

Tableau I.9 : influence de la dialyse sur les caractéristiques azotées d'un surnageant résiduel (issu d'une farine dépolyphénolée extraite à 50 g/L avec une solution de NaOH 0,1 N).

	Pureté protéique (%)	**Rendement protéique global (%)**
Surnageant résiduel	41,7 ± 1,7	15,2 ± 0,6
Surnageant résiduel dialysé	89,6 ± 3,4	9,2 ± 0,8

** Caractérisation du surnageant dialysé.*

La taille moléculaire des protéines et des composés phénoliques présents dans les surnageants résiduels (dialysé ou non) est caractérisée par CLHP-ET (figure I.9). Les profils chromatographiques à 214 nm montrent que les surnageants résiduels sont principalement composés d'albumines (≈ 75 %), la matière protéique restante étant probablement des sous-unités de globulines ou toute autre protéine soluble. La dialyse permet d'éliminer les traces d'azote non protéique (≈ 8 %).

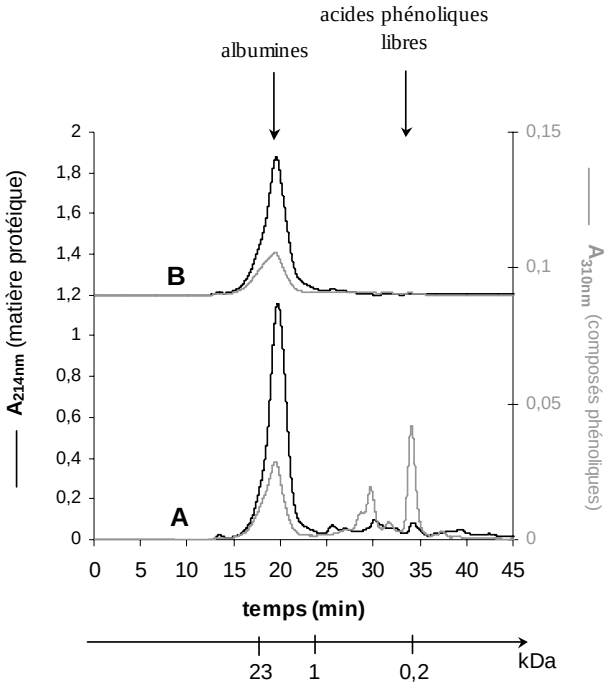


Figure I.9 : chromatogrammes d'exclusion de taille à 214 nm (protéines) et à 310 nm (composés phénoliques) (A) d'un surnageant résiduel issu d'une farine dépolyphénolée et (B) du même surnageant après dialyse. Système chromatographique : colonne Superdex Peptide H/R 10/30, détection : 214 nm et 310 nm, solvant : eau/ACN/TFA (60/40/0,1), débit : 0,6 mL/mn.

Les profils chromatographiques à 310 nm (figure I.9) montrent que la dialyse permet d'éliminer les composés phénoliques libres restants dans le surnageant résiduel même après l'étape de dépolyphénolisation de la farine. Cependant, les composés phénoliques liés aux protéines ne sont pas éliminés par cette étape.

Afin de s'assurer que le surnageant dialysé est essentiellement composé d'albumines, il a été analysé par SDS-PAGE en condition non réductrice et en condition réductrice. Les profils électrophorétiques sont montrés dans la figure I.10. A titre comparatif, nous avons aussi analysé le précipité isoélectrique dialysé. D'après la ligne 1a du gel, le surnageant dialysé est caractérisé par une bande très intense à 13 kDa et par trois bandes moins intenses entre 18 et 25 kDa. Ainsi, le surnageant dialysé est majoritairement composé de napines dont la taille moléculaire est comprise entre 12,5 et 14,5 kDa (Monsalve *et al.*, 1991). En condition réductrice (ligne 1b), une bande assez à environ 10 kDa apparaît confirmant alors la nature de la protéine. En effet, la napine est composée de deux chaînes (4,5 et 10 kDa) reliées par des ponts disulfures (Ericson *et al.*, 1986 ; Monsalve *et al.*, 1990). La taille moléculaire de la petite chaîne est trop petite pour être observée dans le gel électrophorétique. Toutefois, en condition réductrice, la bande à 13 kDa ne disparaît pas totalement. Ceci est peut-être dû à une mauvaise réduction des ponts disulfures.

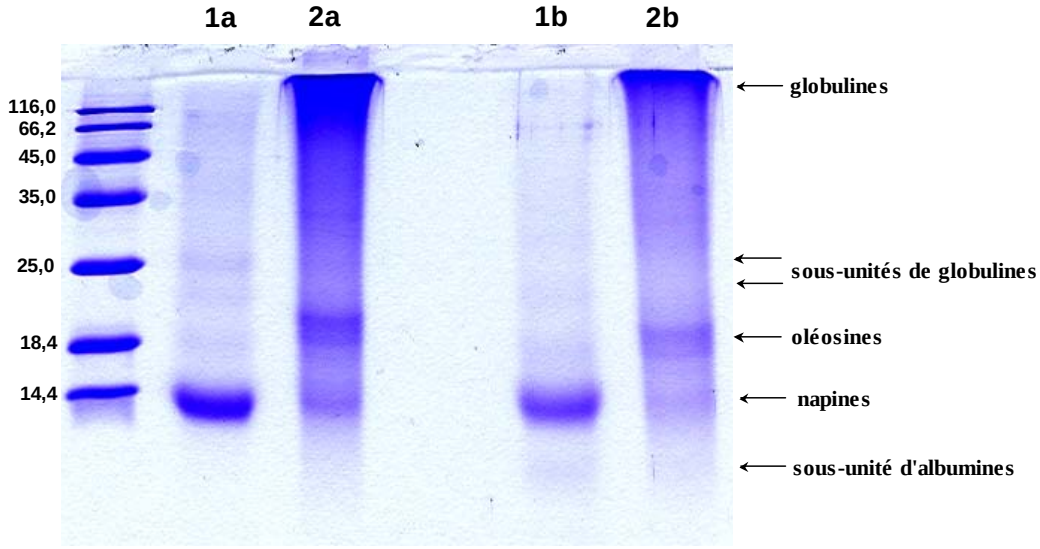


Figure I.10 : profils électrophorétiques par SDS-PAGE des isolats protéiques produits : le surnageant dialysé (lignes 1) et le précipité isoélectrique (lignes 2), en condition non réductrice (lignes a) et en condition réductrice (lignes b). Le gel de migration est à 15 % (p/v) de polyacrylamide. La réduction des ponts disulfures a été réalisée en présence de 5 % de β-mercaptoéthanol.

Le précipité isoélectrique se caractérise par un dégradé (de couleur plus intense vers les protéines de très haute masse molaire) dans lequel deux bandes peuvent être distinguées à 20 kDa et 13 kDa (figure I.10). Ce substrat serait composé de l'ensemble des protéines. Il comporterait majoritairement des globulines dont la taille moléculaire est supérieur à 300 kDa, des protéines de taille moléculaire de l'ordre de 20 kDa (soit des oléosines, soit des précurseurs de la napine (Murphy *et al.*, 1989 ; Monsave *et al.*, 1990)), et de la napine.

La composition chimique globale du surnageant dialysé et la composition en acides aminés de ses protéines ont été caractérisées (respectivement tableaux I.10 et I.11).

Le tableau I.10 montre que le surnageant dialysé est un isolat protéique détoxifié de l'acide phytique. Il présente une teneur très faible en composés phénoliques et en fibres (< 0,25 %). La teneur en lipides est relativement importante puisqu'elle atteint 7 %. Il présente une teneur en cendre (1,8 %) supérieure à celle du précipité isoélectrique (0,8 %).

D'après le tableau I.11, la composition en acides aminés des protéines du surnageant est assez différente de celle classiquement trouvée pour les albumines, notamment pour les proportions en glutamine et acide glutamique (= Glx) et en lysine. En effet, notre substrat comprend 30 % de Glx et 6,2 % de Lys au lieu, respectivement, des 20 % et 13,6 % classiquement retrouvés (Simard *et al.*, 1977). La composition en acides aminés de la napine diffère peu de celle trouvée pour le précipité isoélectrique. Enfin, la composition en acides aminés des deux isolats protéiques est en adéquation avec celle recommandée par la FAO/WHO/UNO excepté pour les acides aminés soufrés.

Tableau I.10 : composition chimique du surnageant résiduel dialysé et comparaison avec celle du précipité isoélectrique.

	Teneur en % (base de la matière sèche)	
	Surnageant dialysé	**Précipité isoélectrique**
protéines	90,8	91,4
lipides	7,0	6,6
cendres	1,8	0,8
composés phénoliques totaux	0,25	0,2
tanins	0,0	0,05
acides phytiques	0,0	0,0
fibres + sucres solubles	0,1	1,0

Humidité du surnageant dialysé lyophilisé = 11,1 %.

Tableau I.11 : composition en acides aminés des protéines du surnageant dialysé et du précipité isoélectrique (% massique).

Acide aminé	**Surnageant résiduel dialysé**	**Précipité isoélectrique**
Asx	5,1	9,5
Glx	30,4	20,2
Ser	4,1	4,4
His	4,7	5,1
Gly	1,9	1,7
Thr	4,4	4,7
Ala	3,4	3,5
Arg	8,6	9,8
Tyr	3,7	4,5
Cys	0,1	0,0
Val	4,3	3,3
Met	0,5 (0,6*)	1,2 (1,2*)
Phe	3,7 (7,4**)	5,7 (10,2**)
Ile	4,3	5,3
Leu	8,5	9,1
Lys	6,2	4,7
Pro	6,4	6,8
Trp	n.d.	n.d.

* : Met + Cys ; ** : Phe + Tyr.
n.d. : non déterminé.

I.3.4. Récapitulatif de la préparation d'isolats protéiques.

Ces travaux ont permis d'établir un procédé de production d'isolats protéiques à partir de farine de tourteaux de colza. Ce procédé consiste successivement à pré-extraire quatre fois la farine avec un mélange éthanol/eau de ratio volumique 2/1, à extraire la farine avec une solution de soude 0,1 N, à réaliser une précipitation isoélectrique des protéines extraites et à dialyser le précipité isoélectrique et le surnageant résiduel contre de l'eau.
Ce procédé a été mis en œuvre pour produire environ 600 g de précipité isoélectrique que nous appellerons, par la suite, « isolat de globulines » ou, plus simplement, « Globulines » et environ 250 g de surnageant dialysé que nous appellerons « isolat d'albumines » ou encore « Albumines ».

Les protéines végétales intéressent souvent les industriels de l'agroalimentaire et de la cosmétique pour leur capacité à posséder diverses propriétés fonctionnelles comme des propriétés moussantes ou émulsifiantes. De plus, leur hydrolyse enzymatique est reconnue pour améliorer, dans quelques cas, ces propriétés. Il est également admis que, certaines de ces propriétés, comme par exemple la solubilité, sont susceptibles d'influencer l'hydrolyse des protéines. Dans ce contexte, l'étude suivante vise à caractériser les propriétés fonctionnelles des isolats précédemment produits et à évaluer l'influence de l'hydrolyse enzymatique sur de telles propriétés.

I.4. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES ISOLATS ET DE LEURS PRODUITS D'HYDROLYSE.

I.4.1. Propriétés fonctionnelles des isolats.

Les propriétés fonctionnelles des isolats (tableau I.12) ont été évaluées grâce aux méthodes utilisées par Vioque *et al.* (2000).

Tableau I.12 : propriétés fonctionnelles des isolats.

Propriété fonctionnelle	Globulines	Albumines
Solubilité à pH 4,5	9,9	90,1
Rétention d'huile (mL huile / 100g)	87 ± 4	162 ± 14
Capacité moussante (%)	44 ± 2	60 ± 4
Stabilité moussante (%)	5 ± 3	67 ± 2
Activité émulsifiante (%)	18 ± 2	35 ± 2
Stabilité émulsifiante (%)	30 ± 3	48 ± 9

Les propriétés fonctionnelles de l'isolat de globulines (produit dans ce travail) sont assez faibles mais elles sont bien plus élevées que celles de l'isolat de protéines de tourteaux de colza généré par Vioque *et al.* (2000). Par exemple, par rapport à la capacité moussante et l'activité émulsifiante de l'isolat produit par Vioque et al. (2000) dont les valeurs sont proches de zéro, celles de l'isolat de globulines sont respectivement de 44 % et de 18 %. Cette différence proviendrait de l'état plus ou moins dénaturé des protéines.

Les propriétés rhéologiques d'un produit alimentaire sont influencées par la solubilité des protéines et leur capacité à retenir l'huile. La solubilité azotée des différents hydrolysats a été déterminée à pH 4,5, point isoélectrique des globulines. Contrairement aux globulines qui sont peu solubles (10 %), les albumines sont solubles à plus de 90 %. Cette différence provient du mode de préparation des isolats. Les albumines possèdent une excellente capacité à retenir l'huile (162 mL/100 g), celle-ci étant deux fois plus élevée que celle des globulines (87 mL/100 g).

Les albumines sont caractérisées par des propriétés moussantes médiocres mais supérieures à celles des globulines. En particulier, la stabilité moussante des albumines dans le temps (65 % après 1 h) est environ 13 fois supérieure à celle des globulines (5 % après 1 h). Enfin, comme cela a été observé par Vioque *et al.* (2000) ou Xu et Diosady (1994), les isolats ne possèdent pas de propriétés émulsifiantes très importantes.

La valorisation des isolats dans l'agroalimentaire ou la cosmétique nécessite une amélioration de leurs propriétés fonctionnelles. La protéolyse est un procédé classique qui permet d'obtenir de tels mélanges ou de telles molécules grâce à la génération de peptides.

I.4.2. Propriétés fonctionnelles d'hydrolysats.

Les isolats de globulines et d'albumines sont hydrolysés avec l'Alcalase 2,4L, solution commerciale de protéases (majoritairement la subtilisine Carlsberg) couramment utilisée en recherche et dans l'industrie agroalimentaire pour la préparation d'hydrolysats possédant des propriétés fonctionnelles. Suivant les recommandations du fabricant (Novozymes), un pH de 8 et une température de 50 °C sont choisis pour l'hydrolyse. La concentration en protéines est de 18,8 g/L. L'étendue de l'hydrolyse, caractérisée par le degré d'hydrolyse (DH), est suivie par la méthode du pH-Stat. Les hydrolysats étudiés sont de DH 5, 10 ou 15 %.

I.4.2.1. Solubilité et rétention de l'huile des hydrolysats.

La figure I.11 montre que l'hydrolyse limitée des protéines de l'isolat de globulines améliore fortement leur solubilité puisque celle-ci augmente continuellement avec le DH, passant de 10 % pour les protéines non dégradées à plus de 64 % pour les hydrolysats. Toutefois ces valeurs sont inférieures à celles obtenues avec l'isolat et les hydrolysats d'albumines qui sont solubles à plus de 90 %. L'augmentation de la solubilité des globulines serait due à une réduction de la taille moléculaire et à une diminution de l'hydrophobie des chaînes protéiques, provoquant une exposition des groupes polaires et chargés défavorables à l'agrégation des molécules peptidiques.

Le tableau I.13 montre que l'hydrolyse limitée des globulines améliore leur capacité d'adsorption de l'huile. La rétention d'huile est cependant plus importante à un DH de 5 % (144 mL / 100 g) qu'à DH 10 % ou DH 15 %. Inversement, alors que les albumines possèdent une excellente capacité à retenir l'huile (162 mL / 100 g), leur hydrolyse conduit à une nette diminution de cette valeur (inférieure à 93 mL / 100 g). Mahajan et Dua (1998) ont émis l'hypothèse qu'une meilleure rétention de l'huile des hydrolysats (cas des globulines) proviendrait de l'exposition de groupes hydrophobes initialement enfouis à l'intérieur des protéines. Inversement, les albumines seraient capables de piéger l'huile mais leur hydrolyse provoquerait une diminution du volume de ces zones hydrophobes (Bombara *et al.*, 1997).

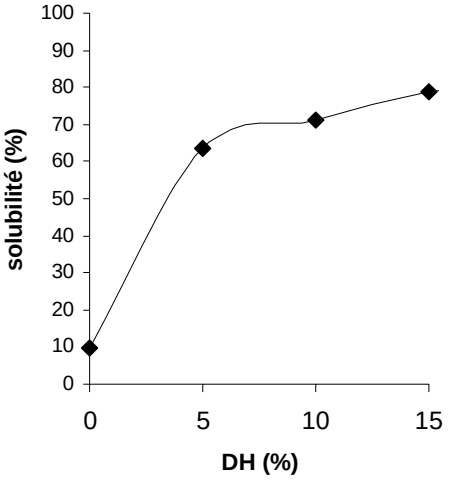


Figure I.11 : solubilité azotée à pH 4,5 des hydrolysats de l'isolat de globulines.

Tableau I.13 : capacité des hydrolysats à fixer l'huile.

	Capacité à fixer l'huile (mL huile / 100 g)	
DH	Hydrolysats de l'isolat de globulines	Hydrolysats de l'isolat d'albumines
sans enzyme	87 ± 4	162 ± 14
5	144 ± 16	93 ± 12
10	126 ± 10	89 ± 8
15	104 ± 12	72 ± 6

I.4.2.2. Propriétés moussantes des hydrolysats.

Les hydrolysats possèdent de meilleures capacités moussantes que les protéines originelles leur correspondant. L'excellente capacité moussante des hydrolysats de l'isolat d'albumines (entre 87 et 91 %), supérieure à celle des globulines (entre 53 et 63 %), est toutefois contrebalancée par leur assez mauvaise stabilité dans le temps (figure I.13). Cette mauvaise stabilité moussante (volume de mousse restant après un temps donné par rapport au volume de mousse initial) des hydrolysats a déjà été observée par plusieurs auteurs (Mahajan et Dua, 1998 ; Pedroche *et al.*, 2004 ; Chobert *et al.*, 1996). Les peptides de taille trop petite, hydrophiles et/ou chargés stabiliseraient moins bien l'interface eau/air que les peptides plus longs, plus hydrophobes et/ou moins chargés (Pedroche *et al.*, 2004).

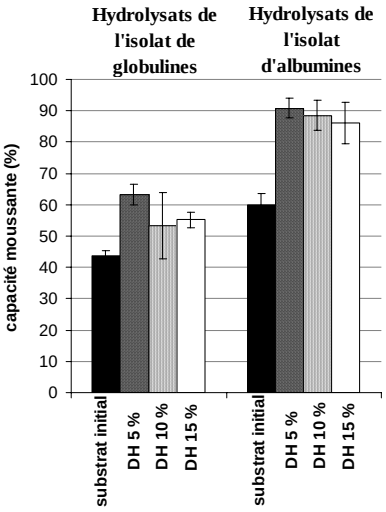


Figure I.12 : capacité moussante des hydrolysats obtenus à différentes valeurs de DH.

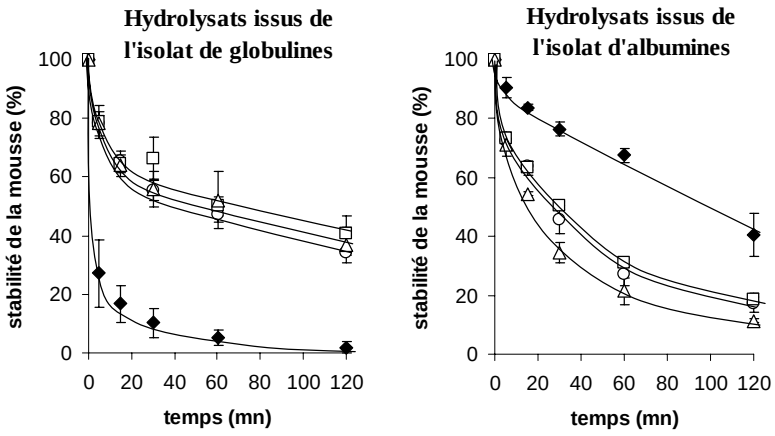


Figure I.13 : stabilité moussante des isolats (♦) et des hydrolysats de DH 5 % (○), de DH 10 % (□) et de DH 15 % (Δ).

I.4.2.3. Propriétés émulsifiantes des hydrolysats.

Lorsque les protéines des isolats sont hydrolysées jusqu'à un DH de 5 %, leurs propriétés émulsifiantes sont améliorées, atteignant des valeurs similaires entre les albumines et les globulines (tableau I.14). L'activité émulsifiante et la stabilité de l'émulsion des hydrolysats de DH 5 % sont 1,5 à 2,8 fois plus élevées que celles des substrats originels. Une hydrolyse plus poussée (DH de 15 %) conduit à une perte de ces propriétés émulsifiantes. Ceci peut être liée à la présence de grandes quantités de petits peptides qui sont bien moins efficaces dans la réduction de la tension interfaciale.

Les résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui préconise un DH d'environ 3 – 10 % pour obtenir de bonnes propriétés émulsifiantes.

Tableau I.14 : activité émulsifiante et stabilité émulsifiante d'hydrolysats de protéines de farine de tourteaux de colza.

	Hydrolysats de l'isolat de globulines				**Hydrolysat de l'isolat d'albumines**			
DH (%)	–	5	10	15	–	5	10	15
Activité émulsifiante (%)	18 ± 2	50 ± 2	49 ± 6	11 ± 3	35 ± 2	51 ± 2	54 ± 1	44 ± 5
Stabilité de l'émulsion (%)	30 ± 3	45 ± 4	34 ± 2	11 ± 3	48 ± 9	69 ± 10	38 ± 1	29 ± 5

I.4.3. Récapitulatif des propriétés fonctionnelles des isolats et hydrolysats protéiques.

Les isolats de protéines possèdent de mauvaises ou de médiocres propriétés fonctionnelles à l'exception de la capacité de rétention d'huile des albumines.

L'hydrolyse partielle des isolats jusqu'à un DH de 5 % permet d'améliorer certaines propriétés fonctionnelles au détriment d'autres. En effet, l'hydrolyse des albumines provoque une augmentation de leur activité moussante, de leurs propriétés émulsifiantes mais elle entraîne, en contre partie, une diminution de leur capacité à retenir l'huile et de leur stabilité moussante. L'hydrolyse limitée des globulines permet d'améliorer de manière plus ou moins importante l'ensemble de leurs propriétés fonctionnelles mais leurs valeurs sont, en règle générale, différentes de celles obtenues avec les hydrolysats d'albumines. Ces résultats mettent donc en évidence l'importance de la nature des protéines (séquence primaire, structure tertiaire, groupements hydrophiles et hydrophobes) lors de la production d'hydrolysats aux propriétés fonctionnelles ciblées.

L'évolution de la solubilité des globulines au cours de l'hydrolyse montre une évolution de la nature du substrat avec l'avancement de la réaction. Il est alors probable que cette modification du substrat puisse influencer la cinétique de l'hydrolyse.

I.5. CONCLUSION.

Cette étude nous a permis de produire deux isolats protéiques distincts au niveau du type de protéines les constituant et de la composition en acides aminés de ces dernières. Le premier, appelé isolat de globulines ou Globulines, est majoritairement composé de globulines et de grosses protéines tandis que le second, dénommé isolat d'albumines ou Albumines, ne

contient, pour l'essentiel, que des napines. L'obtention de ces isolats nécessite un procédé divisé en quatre étapes : une pré-extraction de la farine avec un mélange éthanol/eau afin d'éliminer principalement les composés phénoliques et l'azote non protéique, une extraction basique de la farine dépolyphénolée afin de solubiliser les protéines tout en éliminant les fibres, une précipitation isoélectrique des protéines afin de récupérer sélectivement, d'une part, les globulines (et grosses protéines) et, d'autre part, les albumines, et enfin, la dialyse des deux fractions protéiques précédentes pour éliminer les composés non-protéiques restants. Ces deux isolats sont quasiment exempts en composés antinutritionnels (acide phytique et composés phénoliques) et fibres.
Ne possédant pas de bonnes propriétés fonctionnelles, les isolats ont été hydrolysés avec l'Alcalase 2,4L. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats varient significativement selon l'isolat utilisé. Ceci a permis de mettre en évidence l'importance de la nature des protéines constituant le substrat initial lors de la génération d'hydrolysats aux propriétés fonctionnelles.

Un autre paramètre essentiel pour l'élaboration d'hydrolysats possédant des propriétés fonctionnelles ou des activités biologiques est la nature de l'enzyme utilisée. L'étude suivante vise, à travers la recherche d'hydrolysats biologiquement actifs sur la croissance de cellules animales cultivées dans un milieu sans sérum, à comparer l'action hydrolytique de différentes solutions protéasiques commerciales sur l'isolat de globulines.

II. COMPARAISON DE L'ACTION HYDROLYTIQUE DE DIFFERENTES PROTEASES.

II.1. INTRODUCTION.

L'une des voies de production de peptides à haute valeur ajoutée est l'hydrolyse enzymatique de protéines alimentaires. Etant donné que l'activité biologique d'un peptide est liée à sa composition intrinsèque et à sa séquence en acides aminés, la génération de tels peptides ou hydrolysats est dépendante, avant tout, de la nature du substrat et de la spécificité de la protéase utilisées.

Dans ce contexte, l'un des objectifs de ce travail est d'identifier des protéases qui permettent la libération de tels peptides à partir de protéines de tourteaux de colza. Afin de produire une large gamme d'hydrolysats composés de peptides aux caractéristiques physico-chimiques différentes (séquence en acides aminés, taille, rapport hydrophilie / hydrophobie), l'isolat de globulines sera hydrolysé par sept préparations commerciales d'endoprotéases différant selon leur nature, leur pureté et/ou leur mécanisme catalytique : trois subtilisines, trois protéases neutres (deux métalloprotéases et une protéase à sérine) et une papaïne.

Cette étude vise à évaluer les potentialités de chaque préparation protéasique, tant au niveau de leur efficacité protéolytique, qu'au niveau de la nature et de l'activité biologique des peptides qu'elles permettent de générer. Pour cela, dans une première partie, les hydrolyses seront réalisées dans des conditions opératoires définies afin de s'affranchir de l'influence du pH et de la température sur le substrat. Un pH de 7,5 et une température de 40 °C sont choisis parce qu'ils correspondent aux valeurs moyennes de pH et de température pour lesquelles, d'après les fournisseurs, les enzymes sélectionnées sont actives. Parmi les nombreuses activités biologiques pouvant être expérimentées avec les peptides, nous avons choisi d'étudier leur influence sur la croissance de cellules animales cultivées dans un milieu sans sérum de veau fœtal. Les cellules choisies sont de type CHO (Chinese Hamster Ovary) : cellules animales très employées dans l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines recombinantes. Dans une seconde partie, les conditions optimales de pH et de température des préparations protéasiques seront déterminées suite à la modélisation de leur activité protéolytique en fonction de ces paramètres. Ceci nous permettra alors de comparer les enzymes dans leurs conditions opératoires les plus favorables et d'aboutir au choix des deux enzymes les plus intéressantes pour la génération de peptides actifs.

II.2. COMPARAISON DE L'ACTION HYDROLYTIQUE DE DIFFERENTES PROTEASES DANS DES CONDITIONS OPERATOIRES DEFINIES.

La première partie de ce travail consiste à comparer l'efficacité catalytique à pH 7,5 et 40 °C de sept préparations enzymatiques commerciales sur l'isolat de globulines, à étudier la nature et la solubilité des peptides produits dans ces conditions réactionnelles et à évaluer l'influence de ces derniers sur la croissance de cellules eucaryotes.

Afin de produire un ensemble de peptides aux propriétés les plus variées possibles, les protéases sélectionnées dans cette étude sont de nature différente. Les critères de sélection ont été les suivants :

- les protéases sont d'origine végétale ou bactérienne pour répondre aux contraintes des solutions peptidiques dans les milieux de culture de cellules animales. De ce fait, aucune protéase d'origine animale (trypsine, chymotrypsine ou pepsine) n'a été choisie,
- les protéases sont toutes des endoprotéases. Afin d'éviter la production d'acides aminés libres indésirables pour l'élaboration d'un milieu de culture pour cellules animales, aucune exoprotéase n'a été choisie,
- étant donné que le pH et la température influencent la conformation et la solubilité des protéines, le pH optimal et la température optimale des enzymes couvrent des zones différentes. Toutefois les pH optimaux ne sont pas situés dans les zones de pH acides (pH < 6,5) afin de pouvoir conduire les expériences d'hydrolyse par la méthode pH-Stat,
- la spécificité des protéases est plus ou moins importante,
- tous les types de protéase sont représentés : protéase à sérine, protéase à cystéine ou métalloprotéase. Chaque type de protéase possède des mécanismes catalytiques différents d'où des possibilités différentes d'être inhibées ou activées par le substrat ou les produits d'hydrolyse.

Les préparations enzymatiques sélectionnées sont trois subtilisines : l'Alcalase 2,4L, l'Orientase 90N et l'Espérase 7,5L ; trois protéases neutres : la Neutrase 0,8L, la Prolyve BS (deux métalloprotéases) et la Pronase SG (une protéase à sérine) ; et une protéase à cystéine : la Lypaïne 6500. Excepté la Pronase SG qui est pure, les préparations protéasiques sont majoritairement composées d'une protéase mais elles peuvent contenir d'autres endoprotéases en proportion minoritaire ; dans la suite de ce travail, nous généraliserons l'emploi de « préparation protéasique » par « protéase ».

II.2.1. Mesure de l'activité protéolytique des différentes enzymes dans des conditions opératoires définies.

En règle générale, la comparaison de différentes protéases sur un substrat donné s'effectue sur la base de la quantité d'enzyme ajoutée dans le réacteur, sans aucune considération de leur activité protéolytique. Or cette dernière varie d'un lot à l'autre, d'une protéase à l'autre et suivant les conditions opératoires de l'hydrolyse. C'est pourquoi, nous avons comparé les différentes protéases sur la base de leur activité protéolytique (par rapport à un substrat bien défini).

L'activité protéolytique des enzymes a été déterminée dans des conditions standard (pH 7,5 et 40 °C) en utilisant l'hémoglobine dénaturée suivant la méthode de Anson. Les tableaux II.1 et II.2 présentent respectivement l'activité protéolytique des protéases étudiées, en UA/g pour les préparations sous forme de poudre ou en UA/mL d'enzyme pour les préparations liquides.
L'activité protéolytique varie beaucoup d'une protéase à l'autre : par exemple, la Lypaïne 6500 est environ 150 fois moins active que la Pronase SG. Ceci est dû au fait que les protéases possèdent des mécanismes catalytiques différents, des spécificités différentes et/ou lorsqu'elles présentent le même mécanisme et la même spécificité, ne sont pas formulées à la même concentration ou sous le même état (cas de la Prolyve BS et de la Neutrase 0,8 L qui sont toutes deux des métalloprotéases neutres à Zn^{2+} commercialisées soit sous forme liquide, soit sous forme de poudre).

Tableau II.1 : activité protéolytique des protéases sous forme de poudre, en UA/g d'enzyme, déterminée suivant la méthode de Anson à pH 7,5 et 40 °C.

Protéase	**Activité protéolytique (UA/g d'enzyme)**
Prolyve BS	$9{,}0 \times 10^3$
Orientase 90N	$1{,}8 \times 10^5$
Pronase SG	$3{,}1 \times 10^5$

Tableau II.2 : activité protéolytique des protéases sous forme liquide, en UA/mL d'enzyme, déterminée suivant la méthode de Anson à pH 7,5 et 40°C.

Protéase	**Activité protéolytique (UA/mL d'enzyme)**
Alcalase 2,4L	$1{,}5 \times 10^5$
Espérase 7,5L	$1{,}2 \times 10^5$
Lypaïne 6500	$2{,}0 \times 10^3$
Neutrase 0,8L	$1{,}2 \times 10^4$

Sachant que l'Alcalase 2,4L est connue pour être une protéase très active sur de nombreux substrats, les résultats montrent que l'Espérase 7,5L et l'Orientase 90N sont également très actives ($\approx 1{,}5 \times 10^5$ UA/g ou UA/mL). Les protéases neutres, la Neutrase 0,8L et la Prolyve BS, et la papaïne sont plus de dix fois moins actives que ces dernières. La Pronase SG, qui est pourtant une protéase à grande spécificité, possède une activité environ deux fois supérieure à celle des subtilisines. Finalement, le classement des enzymes suivant leur activité

protéolytique (sur le substrat hémoglobine), de la plus active à la moins active, est le suivant : Pronase SG, Orientase 90N, Alcalase 2,4L, Espérase 7,5L, Prolyve BS, Neutrase 0,8L et Lypaïne 6500.

II.2.2. Cinétique d'hydrolyse pour différentes enzymes.

Des cinétiques d'hydrolyse ont alors été réalisées sur les Globulines, à pH 7,5, 40 °C et pour une concentration initiale en protéines de 18,8 g/L. Les hydrolyses sont effectuées à une faible concentration en protéines afin de comparer les performances des différentes enzymes. Les cinétiques d'hydrolyse ont été suivies pendant 3 h par la méthode pH-Stat avec un ratio enzyme/protéine (Eo/So) variant de $7{,}0 \times 10^1$ à $6{,}0 \times 10^4$ UA/g de protéines.

La figure II.1 présente les courbes d'hydrolyse obtenues avec les différentes protéases et pour un ratio Eo/So de 2×10^3 UA/g de protéines. Il est observé que, quelle que soit la protéase utilisée, les courbes d'hydrolyse présentent une allure asymptotique classiquement retrouvée pour l'hydrolyse enzymatique des protéines ; cependant, le plateau correspondant à un DH maximal n'est pas atteint en 3 h. Ces courbes sont caractérisées par une vitesse initiale d'hydrolyse rapide, correspondant à une quantité importante de liaisons peptidiques clivées par unité de temps, suivie d'une diminution progressive de la vitesse d'hydrolyse.

La figure I.1 montre également qu'en l'absence d'enzyme, l'hydrolyse chimique des protéines à pH 7,5 et 40 °C est très faible puisque, même après 3 h d'hydrolyse, le DH atteint une valeur de 0,3 % seulement. Ainsi, l'hydrolyse chimique peut être considérée comme négligeable.

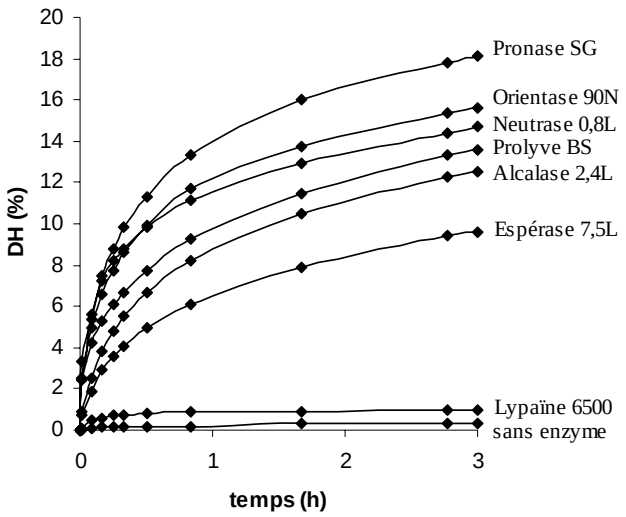


Figure II.1 : cinétiques de l'hydrolyse d'un isolat de protéines de colza (globulines) avec différentes protéases commerciales dans des conditions opératoires définies : pH de 7,5, température de 40 °C, concentration initiale en substrat de 18,8 g/L et ratio enzyme/substrat de 2000 UA/g de protéines.

Il est toutefois observé des différences significatives selon la protéase utilisée. En effet, la Pronase SG est la plus efficace puisqu'elle permet d'atteindre le DH le plus élevé en 3 h avec un DH de 17 % ; puis viennent l'Orientase 90N (DH de 14,7 %), la Neutrase 0,8L (DH de 13,8 %), la Prolyve BS (DH de 12,8 %), l'Alcalase 2,4L (DH de 11,8 %), l'Espérase 7,5L (DH de 9, 0 %) et la Lypaïne 6500 (DH de 1,0 %). Ces résultats montrent qu'il n'existe pas de corrélation entre l'activité protéolytique déterminée sur l'hémoglobine et l'efficacité hydrolytique des protéases sur l'isolat de globulines. Ce comportement avait également été mis en évidence par Kristinsson et Rasco (2000a). Ceci peut s'expliquer soit par une différence de spécificité des protéases et/ou une différence de composition en acides aminés entre les Globulines et l'hémoglobine, soit par des phénomènes d'inhibition ou d'inactivation des enzymes au cours de l'hydrolyse.

L'efficacité catalytique très élevée de la Pronase SG est probablement liée à sa spécificité : en effet, cette enzyme clive préférentiellement en C-terminal des acides glutamique et aspartique, qui sont les acides aminés prépondérants de l'isolat de globulines (près de 30 % des acides aminés totaux). A l'inverse, la Lypaïne 6500 possède une efficacité hydrolytique extrêmement faible envers les Globulines. Cette protéase pourrait être inhibée par ce substrat, non activée par l'absence de cystéine dans le substrat ou inactivée au cours de l'hydrolyse. Les protéases neutres, Neutrase 0,8L et Prolyve BS, présentent une efficacité d'hydrolyse importante des Globulines. Inversement, comme l'ont observé Kristinsson et Rasco (2000a), l'Alcalase 2,4L et l'Espérase 7,5L ne sont pas très efficaces ; cette faible efficacité pourrait provenir d'une faible spécificité de ces protéases pour l'isolat de globulines.

La figure II.2 montre l'influence de la concentration initiale en enzyme sur les cinétiques d'hydrolyse des Globulines. Il est observé que plus la concentration en enzyme augmente, plus le DH augmente. A partir des différentes courbes obtenues, il est possible de tracer la valeur de DH à un temps donné (DHt) en fonction de la concentration initiale en protéase. Ceci a été réalisé dans la figure II.3 pour une durée d'hydrolyse de 2,75 h (non tracé pour l'Orientase 90N).

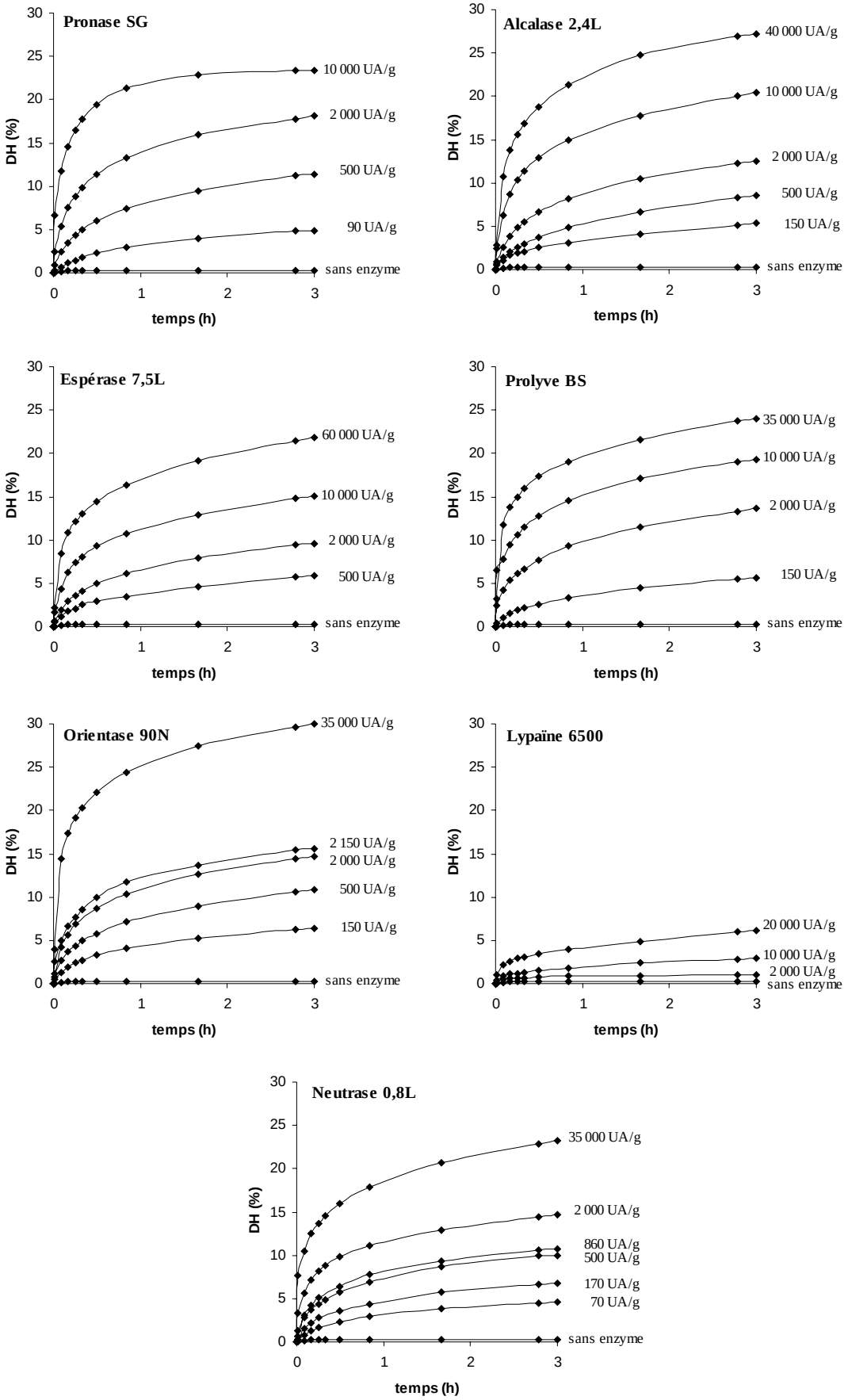


Figure II.2 : hydrolyses enzymatiques d'un isolat de protéines de colza (globulines) avec différentes protéases commerciales et à différents ratios enzyme/substrat. Conditions réactionnelles : pH de 7,5 ; température de 40 °C ; durée de 3 h ; concentration initiale en protéines de 18,8 g/L ; ratio enzyme/substrat : 70 – 60000 UA/g.

La figure II.3 montre qu'il existe une relation linéaire entre le DH et le logarithme de la concentration initiale en protéase. Cette relation est retrouvée quel que soit le temps t. De telles relations ont déjà été mises en évidence dans plusieurs travaux (Baek et Cadwallader, 1995 ; Guerard et al., 2002 ; Simpson et al., 1998 ; Kristinsson et Rasco, 2000a). Elles permettent de caractériser l'efficacité catalytique des enzymes quelle que soit la concentration initiale en enzyme. La Pronase SG reste la protéase la plus efficace et la Lypaïne 6500 est la moins efficace. Toutefois, plus la concentration initiale en enzyme augmente, plus l'Alcalase 2,4L et l'Espérase 7,5L s'avèrent efficaces alors que la Neutrase 0,8L et la Prolyve BS sont, au contraire, moins performantes.

Les relations semi-logarithmiques permettent également de calculer précisément la quantité d'enzyme nécessaire pour atteindre un DH en un temps donné. Connaissant le coût des enzymes, il est alors possible de les comparer sur un critère économique pour obtenir un DH donné. Comme souligné par Lahl et Braun (1994), il existe un compromis entre efficacité et coût. En effet, une augmentation de la concentration en enzyme résulte le plus souvent en une augmentation de la vitesse d'hydrolyse et du DH mais entraîne une augmentation du coût du procédé. Les protéases les moins onéreuses sont l'Alcalase 2,4L et l'Orientase 90 N. Comparativement à ces deux protéases, l'Espérase 7,5L, la Prolyve BS et la Neutrase 0,8L sont approximativement 5 à 10 fois plus coûteuses alors que la Pronase SG l'est environ 500 fois.

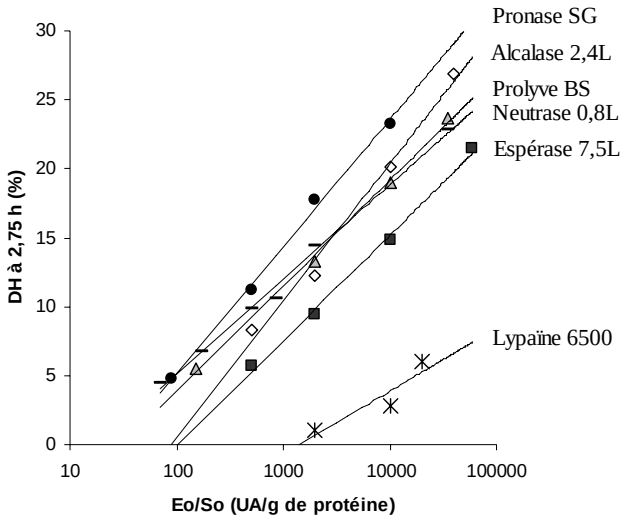


Figure II.3 : relations semi-logarithmiques entre le DH à 2,75 h et le ratio enzyme/substrat Eo/So (exprimée en UA/g) avec une concentration initiale en substrat, So, de 18,8 g/L.

Cette étude préliminaire a permis de comparer l'efficacité hydrolytique de diverses protéases sur l'isolat de globulines de colza. Toutefois, bien que certaines protéases se distinguent des autres par leur efficacité catalytique élevée, comme par exemple la Pronase SG, il est important de caractériser les produits d'hydrolyse obtenus par les différentes protéases pour comparer et évaluer le type de peptides libérés.

II.2.3. Caractérisation des hydrolysats.

II.2.3.1. Distribution de taille moléculaire des hydrolysats.

Les hydrolysats, obtenus par l'action des différentes protéases sur l'isolat de globulines, ont été analysés par CLHP-ET afin de déterminer la distribution de taille moléculaire des peptides produits. Les profils chromatographiques obtenus sont présentés dans la figure II.4.
D'après cette figure, les profils chromatographiques évoluent progressivement en fonction du DH ; plus ce dernier est élevé, plus les protéines de hautes masses molaires (faibles temps de rétention, tr < 20,2 mn) disparaissent au profit de polypeptides ou de peptides de masse molaire plus faible (temps de rétention > 20,2 mn). Il est observé, en particulier, une nette diminution du pic à 13,5 mn correspondant aux globulines (≈ 300 kDa). Ces protéines sont rapidement dégradées en polypeptides plus petits. Les profils chromatographiques sont différents d'une protéase à l'autre, en particulier pour des DH élevés, suggérant des mélanges de peptides de natures différentes.

Chaque préparation enzymatique a également été analysée à la concentration la plus élevée de l'étude afin de s'assurer que cette dernière n'absorbe pas significativement à 214 nm induisant alors une modification non souhaitée du profil chromatographique de l'hydrolysat. D'après la figure II.4, aucune protéase, à l'exception de la Lypaïne 6500, n'absorbe significativement à 214 nm. Ainsi, les chromatogrammes des hydrolysats ne sont pas erronés par la présence de l'enzyme à l'exception de ceux obtenus avec la Lypaïne 6500.

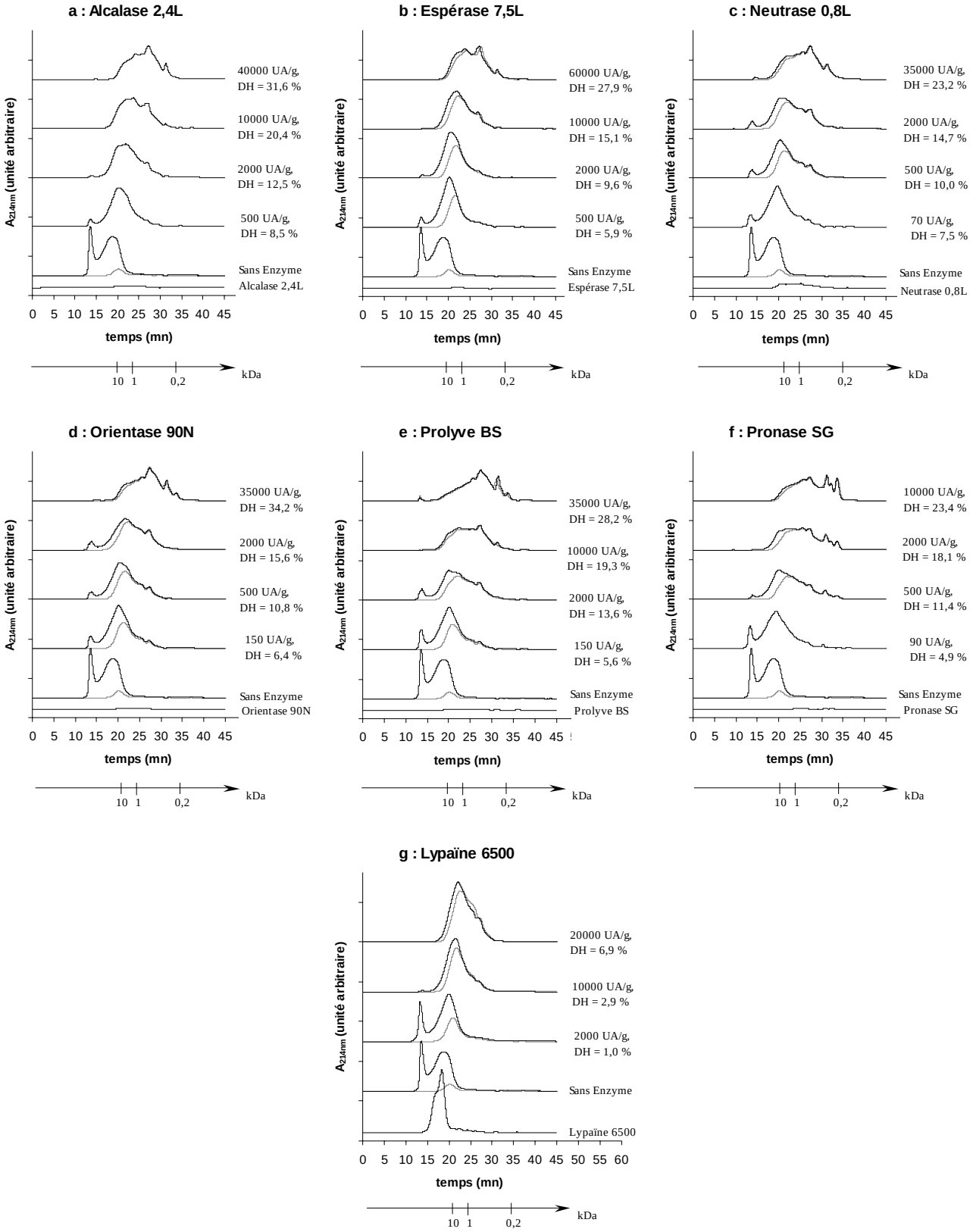


Figure II.4 : profils CLHP-ET des hydrolysats (——) et de leur fraction soluble au point isoélectrique des protéines (pI = 4,5) (——). Les hydrolysats sont obtenus par hydrolyse de l'isolat de globulines par différentes protéases et à différents ratios enzyme/substrat (70 – 60000 UA/g). Conditions réactionnelles : pH de 7,5, température de 40 °C, concentration initiale en substrat de 18,8 g/L. Durée de l'hydrolyse : 3 h ou 13 h. Protéases : (a) Alcalase 2,4L, (b) Espérase 7,5L, (c) Neutrase 0,8L, (d) Orientase 90N, (e) Prolyve BS, (f) Pronase SG et (g) Lypaïne 6500. Système chromatographique : colonne Superdex Peptide H/R 10/30, détection : 214 nm, solvant : eau/ACN/TFA (60/40/0,1), débit : 0,6 mL/mn.

Afin de mieux caractériser l'action hydrolytique des protéases, l'évolution de la répartition de taille des peptides en fonction du DH a été tracée pour chacune des enzymes (figure II.5) excepté pour la Lypaïne 6500 pour la raison évoquée précédemment.

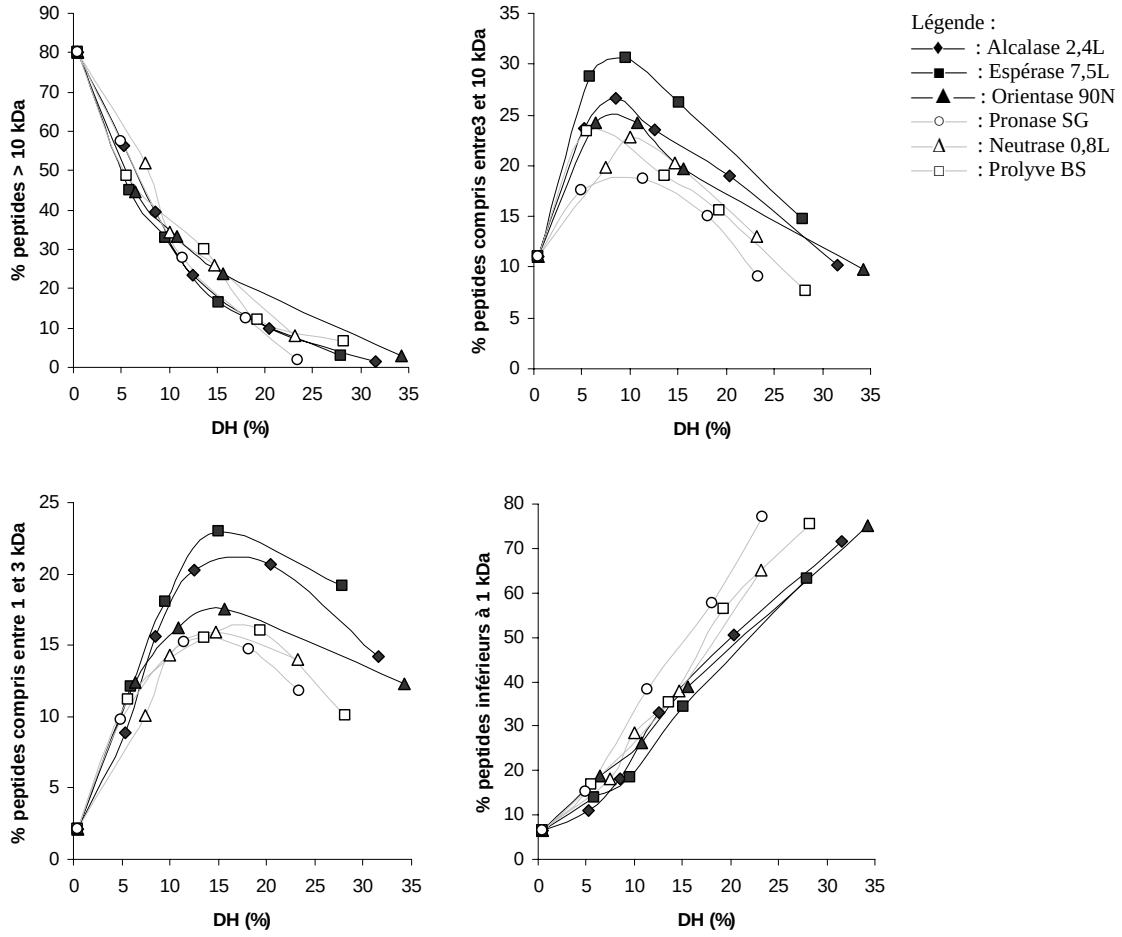


Figure II.5 : évolution en fonction du DH de la répartition de taille des peptides des hydrolysats obtenus par différentes protéases. Conditions réactionnelles : pH de 7,5, température de 40 °C, concentration initiale en substrat de 18,8 g/L et ratio enzyme/substrat variant entre 70 et 60000 UA/g. Durée de l'hydrolyse : 3 h ou 13 h. Système chromatographique : colonne Superdex Peptide H/R 10/30, détection : 214 nm, solvant : eau/ACN/TFA (60/40/0,1), débit : 0,6 mL/mn.

Quelle que soit l'enzyme, les évolutions de chacune des fractions de taille moléculaire montrent des allures caractéristiques répétitives. Ainsi :

- les protéines supérieures à 10 kDa diminuent progressivement pour atteindre une proportion inférieure à 10 % à partir d'un DH compris entre 20 et 28 % selon l'enzyme ;
- les peptides compris entre 3 et 10 kDa apparaissent transitoirement puisque la proportion de ces derniers augmente jusqu'à un DH d'environ 8 – 12 % pour, ensuite, diminuer progressivement. Ces peptides intermédiaires constituent au maximum

jusqu'à 25 – 31 % pour les protéases de type subtilisine (Alcalase 2,4L, Espérase 7,5L et Orientase 90N), jusqu'à 18 – 24 % pour les protéases neutres (Neutrase 0,8L, Prolyve BS et Pronase SG) ;

- les peptides compris entre 1 et 3 kDa sont, comme la fraction précédente, produits progressivement jusqu'à un DH d'environ 15 % pour, ensuite, être hydrolysés. Leur proportion maximale est comprise entre 15 et 23 % suivant le type de protéase ;
- les peptides inférieurs à 1 kDa sont continuellement produits tout au long de l'hydrolyse pour atteindre, suivant l'enzyme, des proportions comprises entre 60 et 75 % au DH maximal de l'étude. Quel que soit le DH, les protéases de type subtilisine génèrent moins de cette sorte de peptides que les protéases neutres.

Ces résultats montrent que, pour toutes les enzymes utilisées, la protéolyse entraîne la formation de longs peptides intermédiaires qui sont ensuite dégradés en de plus petits peptides. Cette composition de l'hydrolysat avec l'avancement de la réaction est caractéristique du mécanisme de type zipper. Selon le type de protéase utilisé, ce mécanisme est plus ou moins accentué. En effet, on peut mettre en évidence que les protéases neutres (Pronase SG, Prolyve BS et Neutrase 0,8L) génèrent plus de petits peptides et moins de peptides de taille intermédiaire que les protéases de genre subtilisine (Alcalase 2,4L, Espérase 7,5L et Orientase 90N). Ainsi, le mécanisme zipper de ces dernières semble plus accentué que celui des protéases neutres.

II.2.3.2. Solubilité azotée et taille moléculaire des peptides solubles.

Parmi toutes les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques, la solubilité est l'une des plus importantes. En effet, la solubilité conditionne, en règle générale, l'incorporation de l'hydrolysat en tant qu'ingrédient dans les aliments. Elle constitue également un paramètre permettant de caractériser l'évolution du substrat au cours de l'hydrolyse.

La solubilité à pH 4,5 des hydrolysats obtenus avec les différentes protéases a été déterminée et tracée en fonction du DH (figure II.6). Ce pH de 4,5 a été choisi car il représente le pH où, initialement, les protéines sont le moins solubles. L'hydrolyse provoque, indépendamment du type de protéase utilisé, une augmentation de la solubilité. Pour des DH supérieurs à 28 %, plus de 90 % des peptides restent solubles. La solubilité serait meilleure avec l'apparition de petits peptides hydrophiles chargés impliquant une faible agrégation suite à la diminution de

leurs interactions hydrophobes et à l'augmentation de leurs interactions électrostatiques (Mahmoud, 1994).

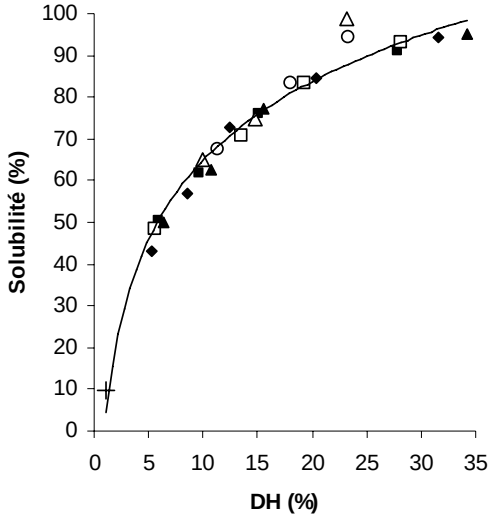


Figure II.6 : solubilité de la matière azotée des hydrolysats au point isoélectrique des protéines (pI = 4,5). Conditions réactionnelles pour l'obtention des hydrolysats complets : pH de 7,5, température de 40 °C, concentration initiale en substrat de 18,8 g/L et ratio enzyme/substrat variant entre 150 et 60000 UA/g. Protéases : (♦) Alcalase 2,4L, (■) : Espérase 7,5L, (▲) : Orientase 90N, (○) : Pronase SG, (Δ) : Neutrase 0,8L, (□) : Prolyve BS, (+) : sans enzyme.

Les fractions solubles des hydrolysats, appelées hydrolysats solubles, ont été caractérisées par CLHP-ET (figure II.4). En comparant les chromatogrammes des hydrolysats initiaux (appelés hydrolysats complets) et des hydrolysats solubles, il apparaît que l'abaissement du pH au point isoélectrique des protéines permet d'éliminer les protéines non dégradées ou les grands polypeptides résultant d'une hydrolyse partielle. Ces molécules de taille moléculaire assez élevée présentent des zones hydrophobes qui permettent leur agrégation au pI. Les hydrolysats solubles ne semblent pas être composés de polypeptides et de peptides de taille moléculaire supérieure à 20 kDa (correspondant à un temps de rétention inférieur à 19 mn). Ainsi, cette étape d'abaissement du pH permet d'enrichir l'hydrolysat en petits peptides. Toutefois, aux DH élevés, ce fractionnement est limité par la solubilité élevée de l'hydrolysat complet.

Le tableau II.3 présente la répartition de taille des peptides présents dans les hydrolysats solubles. Aux faibles valeurs de DH, les hydrolysats solubles sont principalement composés de peptides compris entre 1 et 10 kDa, tandis qu'aux DH élevés, ils sont majoritairement constitués de peptides inférieurs à 1 kDa.

Tableau II.3 : répartition de taille des peptides dans les hydrolysats solubles (à pH 4,5) obtenus avec différentes enzymes.

			Répartition (%)			
Protéase	**UA/g de protéine**	**DH (%)**	***Peptides* > 10 kDa**	**Peptides 3 – 10 kDa**	**Peptides 1 – 3 kDa**	**Peptides < 1 kDa**
Alcalase 2,4L	$0,15 \times 10^3$	5,3	26,3	38,1	17,5	18,2
	$0,5 \times 10^3$	8,5	14,9	34,2	24,6	26,4
	2×10^3	12,5	8,6	23,7	25,8	41,9
	10×10^3	20,4	4,1	16,3	22,5	57,2
	40×10^3	31,6	1,2	8,1	14,2	76,5
Espérase 7,5L	$0,5 \times 10^3$	5,9	18,1	39,1	22,0	20,8
	2×10^3	9,6	11,7	33,8	27,5	27,0
	10×10^3	15,1	6,4	23,5	26,9	43,2
	60×10^3	27,9	1,7	11,3	18,0	69,1
Pronase SG	$0,5 \times 10^3$	11,4	8,1	19,2	20,3	52,4
	2×10^3	18,1	3,8	12,5	16,0	67,7
	10×10^3	23,4	1,0	6,8	11,0	81,2
Neutrase 0,8L	$0,5 \times 10^3$	10,0	13,3	27,1	20,6	39,1
	2×10^3	14,7	9,2	21,0	20,2	49,6
	35×10^3	23,2	3,8	11,3	14,1	70,8
Orientase 90N	$0,15 \times 10^3$	6,4	15,8	33,0	21,5	29,6
	$0,5 \times 10^3$	10,8	12,6	27,6	22,4	37,4
	2×10^3	15,6	8,3	20,4	21,8	49,5
	35×10^3	34,2	1,1	7,6	11,9	79,4
Prolyve BS	$0,15 \times 10^3$	5,6	19,5	34,2	19,6	26,7
	2×10^3	13,6	11,7	21,1	20,6	46,6
	10×10^3	19,3	8,7	14,7	16,6	59,9
	35×10^3	28,2	6,5	7,3	10,0	76,2
Sans enzyme	–	1,1	34,7	31,4	7,9	26,0

II.2.3.3. Aminogrammes des hydrolysats complets ou solubles.

La composition en acides aminés des hydrolysats complets obtenus avec l'Alcalase 2,4L à différents ratios enzyme/substrat a été analysée. Le tableau II.4 montre qu'il n'existe pas de variation significative de la composition en acides aminés entre le substrat initial et chacun des hydrolysats complets. La protéolyse enzymatique permet de conserver globalement la composition en acides aminés des protéines originelles.

La composition en acides aminés des hydrolysats solubles a également été analysée et est présentée dans le tableau II.4. Les hydrolysats solubles sont caractérisés par un aminogramme similaire à celui du substrat originel.

Tableau II.4 : aminogrammes (proportion exprimée en % massique) des hydrolysats complets obtenus avec l'Alcalase 2,4L et des hydrolysats solubles obtenus avec les différentes protéases. Seules les valeurs extrêmes sont inscrites dans le tableau. L'analyse a porté sur les hydrolysats obtenus à pH 7,5, à 40 °C, pour une concentration initiale en protéines de 18,8 g/L et pour différents ratio enzyme/substrat : Alcalase 2,4L (150, 500, 2000, 10000 et 40000 UA/g de protéines), Espérase 7,5L (500, 2000, 10000, 60000 UA/g de protéines), Prolyve BS (150, 2000, 10000, 35000 UA/g de protéines), Orientase 90N (150, 500, 2000, 35000 UA/g de protéines), Neutrase 0,8L (500, 2000, 35000 UA/g de protéines) et Pronase SG (500, 2000, 10000 UA/g de protéines).

% massique			**Hydrolysats solubles**					
	Substrat initial	**Hydrolysats complets**	**Alcalase 2,4L**	**Espérase 7,5L**	**Prolyve BS**	**Orientase 90N**	**Neutrase 0,8L**	**Pronase SG**
Asx	9,5	8,9 – 9,6	9,8 – 10,8	9,9 – 11,3	9,6 – 10,5	10,0 – 10,5	9,8 – 11,6	9,1 – 9,7
Glx	20,2	19,7 – 21,4	20,9 – 22,3	21,2 – 22,5	21,4 – 22,7	20,9 – 21,5	21,0 – 22,0	18,2 – 20,1
Ser	4,4	4,3 – 4,4	4,2 – 4,9	4,2 – 5,2	4,3 – 5,1	4,2 – 4,8	4,2 – 4,4	4,4 – 4,7
His	5,1	4,6 – 5,0	4,8 – 5,0	4,9 – 5,0	4,5 – 5,0	4,7 – 5,0	4,9 – 5,0	4,9 – 5,2
Gly	1,7	1,5 – 1,6	1,6 – 1,6	1,6 – 1,6	1,5 – 1,6	1,6 – 1,6	1,6 – 1,6	1,6 – 1,7
Thr	4,7	4,5 – 4,7	4,9 – 5,2	4,8 – 5,0	4,9 – 5,4	4,6 – 4,9	4,9 – 5,3	4,8 – 5,0
Ala	3,5	3,5 – 3,9	3,8 – 4,5	3,9 – 4,1	3,7 – 4,0	3,6 – 3,7	3,6 – 3,8	3,6 – 3,7
Arg	9,8	9,4 – 9,8	8,3 – 9,0	8,6 – 9,1	9,1 – 9,3	9,2 – 9,4	9,3 – 9,7	9,4 – 9,8
Tyr	4,5	4,4 – 4,8	3,7 – 4,5	3,4 – 4,0	3,8 – 4,4	3,8 – 4,2	3,7 – 4,2	4,5 – 4,9
Cys	0,4	0,2 – 0,3	0,1 – 0,3	0,2 – 0,2	0,2 – 0,2	0,1 – 0,2	0,1 – 0,2	0,2 – 0,3
Val	3,3	3,4 – 3,5	3,2 – 3,5	3,3 – 3,4	3,0 – 3,2	3,2 – 3,3	2,8 – 3,3	3,4 – 3,6
Met	1,2	1,2 – 1,4	1,3 – 1,3	1,3 – 1,3	1,1 – 1,1	1,1 – 1,2	1,0 – 1,2	1,2 – 1,4
Phe	5,7	5,1 – 6,0	4,6 – 5,5	4,5 – 5,2	4,3 – 5,0	5,1 – 5,3	4,6 – 5,3	5,7 – 6,1
Ile	5,3	5,2 – 5,5	4,7 – 5,0	4,6 – 4,9	4,6 – 4,9	4,8 – 5,0	4,6 – 4,9	5,2 – 5,5
Leu	9,1	9,0 – 9,5	8,8 – 9,7	9,1 – 9,6	8,9 – 9,5	9,3 – 9,4	8,6 – 9,5	9,0 – 9,3
Lys	4,7	4,3 – 5,0	4,1 – 4,6	4,1 – 4,6	4,2 – 4,7	4,7 – 5,0	4,4 – 4,9	4,9 – 5,1
Pro	6,8	6,8 – 7,1	6,6 – 7,2	6,8 – 7,2	6,7 – 7,1	7,0 – 7,0	6,5 – 7,1	6,7 – 7,0

Asx : acide aspartique et asparagine ; Glx : acide glutamique et glutamine.

II.2.4. Influence des hydrolysats sur la croissance de cellules animales.

Des hydrolysats solubles, préalablement présentés dans le tableau II.3, ont été évalués pour leur capacité à promouvoir la croissance de cellules CHO C5 en tant qu'additifs à un milieu de culture sans sérum, ou en tant que substituts à certains éléments constitutifs du milieu de base. La croissance de ces cellules animales a été évaluée par dénombrement des cellules totales par analyse d'images, grâce au système Cellscreen. Pour cela, des cellules CHO C5 ont été cultivées dans des micro-plaques à 96 puits avec un volume utile de 200 µL.

Les premières expériences de cette étude concernent l'influence de ces hydrolysats en tant qu'additifs au milieu de culture (sans sérum + TIB).

II.2.4.1. Influence du degré d'hydrolyse sur la croissance cellulaire.

Les hydrolysats solubles obtenus avec différentes protéases et caractérisés par différents DH sont ajoutés à une concentration de 2 g/L dans le milieu de culture. Le suivi cinétique est

réalisé sur 70 h. La concentration cellulaire atteinte, après 70 h, dans les milieux supplémentés avec l'hydrolysat est comparée à celle atteinte dans le milieu de référence (sans hydrolysat) (tableau II.5).

Tableau II.5 : pourcentage de variation de densité cellulaire dans le milieu de culture supplémenté avec l'hydrolysat soluble à 2 g/L par rapport à la densité cellulaire atteinte dans le milieu de culture de référence (sans hydrolysat). Dénombrement des cellules totales par le système Cellscreen après 70 h de culture.

Protéase	**DH (%)**	**% de variation de densité cellulaire par rapport à la référence**
Référence	-	100
Alcalase 2,4L	5,3	85
	8,5	103
	12,5	108
	20,4	117
	31,6	133
Espérase 7,5L	5,9	85
	9,6	92
	15,1	85
	27,9	125
Pronase SG	11,4	100
	18,1	131
	23,4	120
Neutrase 0,8L	10,0	95
	14,7	111
	23,2	133
Orientase 90N	6,4	100
	10,8	112
	15,6	104
	34,2	156
Prolyve BS	19,3	106

Une tendance se dégage de ces résultats ; lorsque le milieu est supplémenté avec des hydrolysats solubles de degré d'hydrolyse faible ou relativement peu élevé (DH < 16 %), la densité cellulaire est plus faible ou légèrement plus élevée que celle de la référence, et inversement, lorsque le milieu est supplémenté avec des hydrolysats solubles de DH élevé (DH > 18 %), la densité cellulaire devient nettement supérieure à celle de la référence ; ce qui, vu la composition des hydrolysats à DH élevé indiquerait que la présence de peptides inférieurs à 1000 Da est un facteur favorable à la croissance cellulaire. Cependant, le rôle de tels peptides dans les milieux de culture n'est pas élucidé. Ainsi, les hydrolysats solubles de DH élevés ont été choisis pour une étude plus avancée.

II.2.4.2. Influence de la spécificité des protéases.

La figure II.7 présente des cinétiques de croissance cellulaire, observées pendant environ 200 h, en présence d'hydrolysats solubles de DH élevé ajoutés à une concentration de 4 g/L dans le milieu de culture. Les résultats montrent que tous les hydrolysats solubles améliorent significativement mais différemment la croissance des cellules CHO C5. En effet, selon le type de protéase utilisé, la concentration cellulaire maximale atteinte est de l'ordre de 1,3 à 2,1 fois plus élevée que celle de la référence. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la Pronase SG et l'Alcalase 2,4L qui permettent de doubler la concentration cellulaire maximale mais les hydrolysats solubles de l'Espérase 7,5 L et de l'Orientase 90N sont également très actifs puisqu'ils permettent de multiplier la densité cellulaire maximale par 1,7. Enfin, l'hydrolysat soluble de la Neutrase 0,8L est le moins actif.

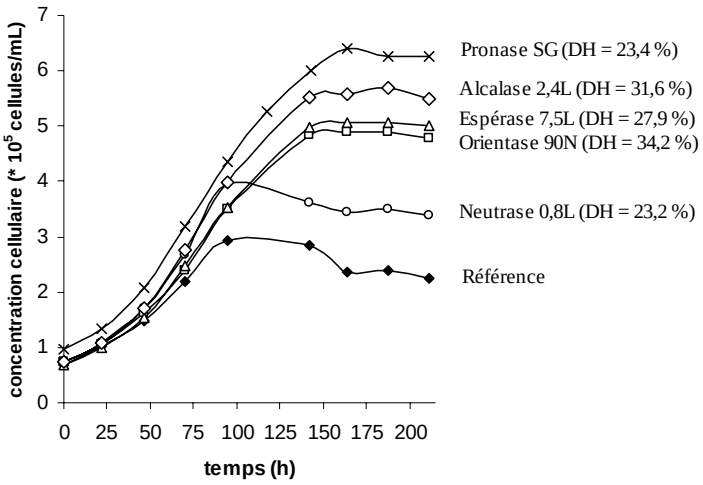


Figure II.7 : suivi par analyse d'images des cinétiques de croissance de cellules CHO (dénombrement des cellules totales par le système Cellscreen). Effet de la supplémentation à 4 g/L d'un milieu de culture sans sérum avec des hydrolysats solubles obtenus avec différentes protéases : (×) Pronase SG et DH = 23,4 %, (◊) Alcalase 2,4L et DH = 31,6 %, (Δ) Espérase 7,5L et DH = 27,9 %, (□) Orientase 90N et DH = 34,2 %, (○) Neutrase 0,8L et DH = 23,2 %. (♦) : référence. Erreur sur la mesure < 5 %.

Tous les hydrolysats solubles utilisés possèdent entre 70 et 80 % de peptides inférieurs à 1000 Da. Ainsi, l'amélioration de la densité cellulaire ne dépend pas uniquement de la proportion en petits peptides et n'est donc pas liée uniquement à un effet nutritionnel. Elle dépend probablement de la spécificité de la protéase utilisée, c'est-à-dire de la nature des peptides générés.

Afin de vérifier ces résultats, des mélanges d'acides aminés libres aux proportions similaires à celles des hydrolysats de globulines ont été ajoutés dans le milieu de culture de référence.

Aucune variation significative n'est observée entre la croissance des cellules cultivées dans le milieu supplémenté en acides aminés et la croissance des cellules cultivées dans le milieu de référence. Ainsi, les peptides n'auraient pas uniquement un rôle nutritionnel.

II.2.4.3. Influence de la concentration en hydrolysat.

L'allure des cinétiques de croissance diffère selon la concentration de l'hydrolysat soluble dans le milieu (2, 4 ou 6 g/L) (figure II.8). En effet, en général, plus cette dernière augmente, plus la vitesse initiale de croissance diminue mais plus la concentration cellulaire finale est élevée. Il existerait donc un effet dose des hydrolysats solubles sur la croissance des cellules animales.

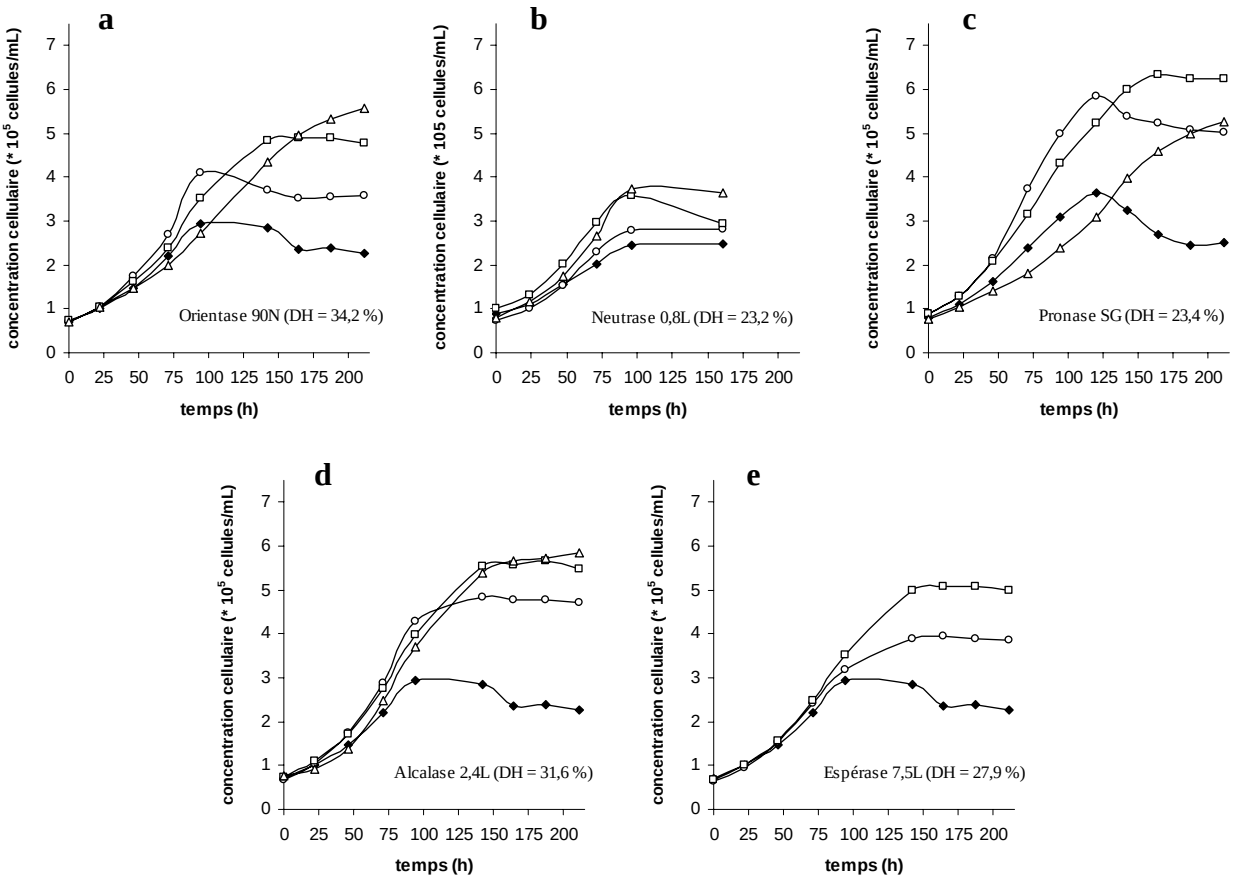


Figure II.8 : suivi par analyse d'images des cinétiques de croissance de cellules CHO (dénombrement des cellules totales par le système Cellscreen). Effet de la supplémentation d'un milieu de culture sans sérum par les hydrolysats solubles à différentes concentrations : (○) : 2 g/L, (□) : 4 g/L, (Δ) : 6 g/L. Hydrolysats : (a) : Orientase 90N DH = 34,2 %, (b) : Neutrase 0,8L DH = 23,2 %, (c) : Pronase SG DH = 23,4 %, (d) : Alcalase 2,4L DH = 31,6 %, (e) : Espérase 7,5L DH = 27,9 %. Référence = sans hydrolysat (♦).

II.2.4.4. Comparaison entre un hydrolysat de colza et un hydrolysat commercial de blé.

L'influence de l'addition des hydrolysats de colza sur la croissance des cellules animales a été comparée avec celle d'un hydrolysat commercial de blé utilisé pour améliorer la croissance de certaines lignées cellulaires, notamment de type CHO (figure II.9).

La supplémentation du milieu de culture avec l'hydrolysat de colza permet, par rapport à la référence, d'augmenter la densité cellulaire maximale de 65 % tandis que celle avec l'hydrolysat de blé ne permet de l'augmenter que de 27 %. L'hydrolysat de colza généré dans cette étude améliore bien plus la croissance cellulaire que l'hydrolysat commercial de blé.

Cette étude reste préliminaire et la vérification de l'action biologique de l'hydrolysat soluble de colza sur d'autres lignées cellulaires devrait être entreprise afin de valider la potentialité de ces hydrolysats en vue d'une exploitation industrielle.

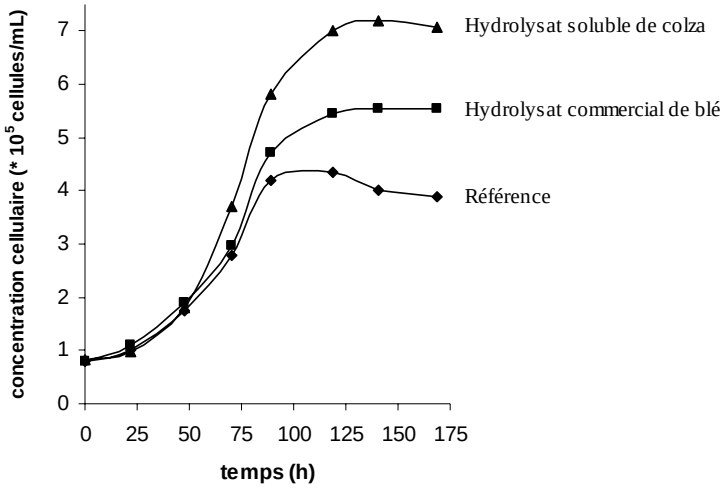


Figure II.9 : suivi par analyse d'images des cinétiques de croissance de cellules CHO (dénombrement des cellules totales par le système Cellscreen). Effet de la supplémentation d'un milieu de culture sans sérum par (■) l'hydrolysat commercial de blé, HP4605, à 2 g/L, ou par (▲) l'hydrolysat soluble de colza de DH 23,4 obtenu avec la Pronase SG. Référence = sans hydrolysat (♦).

II.2.4.5. Morphologie des cellules.

La morphologie des cellules a été observée au cours d'une culture supplémentée avec un hydrolysat généré avec l'Alcalase 2,4L (DH de 31,6 %) grâce aux photographies numériques obtenues par l'analyseur d'image (figure II.10). La morphologie des cellules peut être caractérisée par deux états différents :

- un état où les cellules sont viables et prolifèrent : cellules rondes, brillantes et réfringentes ;
- un état où les cellules ne prolifèrent plus et meurent : cellules de petite taille, non réfringentes, sombres, granuleuses et agrégées les unes aux autres.

A 164 h de culture, les cellules de la culture de référence sont probablement mortes tandis qu'en présence d'un hydrolysat soluble de colza à 2 g/L, ces dernières sont toujours vivantes. Ainsi, en présence d'hydrolysat, le décès cellulaire serait retardé.

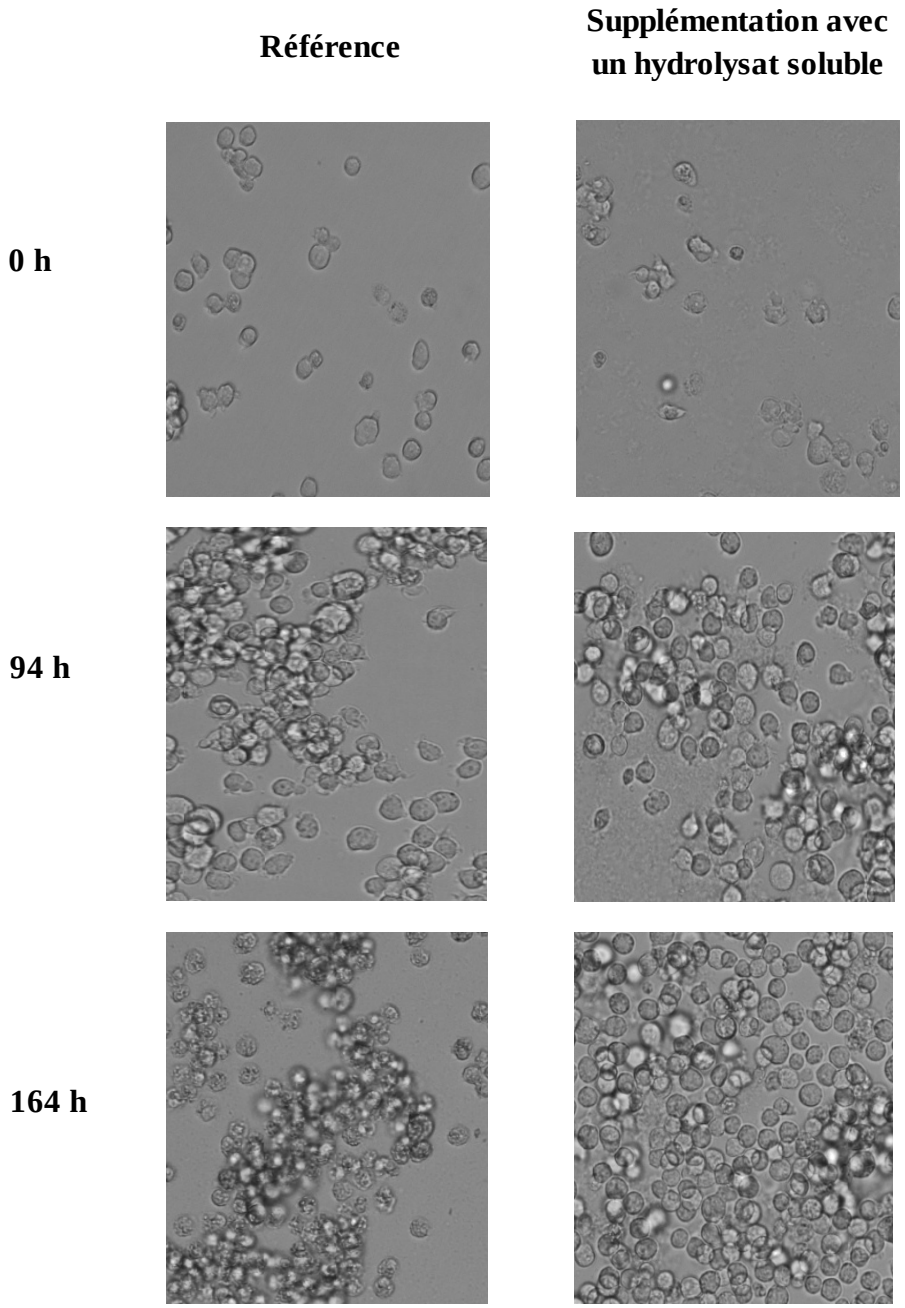


Figure II.10 : photographies numériques des cellules CHO C5 au cours de la culture en microplaques. Le suivi est obtenu soit sur des cellules cultivées dans un milieu de référence, soit dans un milieu additionné, à 2 g/L, de l'hydrolysat soluble obtenu avec l'Alcalase 2,4L et caractérisé par un DH de 31,6 %.

Ces résultats permettent de suggérer qu'en plus de leur valeur nutritionnelle, les peptides joueraient le rôle de facteurs de croissance, de facteurs de survie ou de détoxifiants (Franěk, 2000 ; Kunst, 2000). De tels peptides n'ont pas encore été purifiés et identifiés. Cependant, notre étude précédente a montré que les hydrolysats peptidiques n'avaient pas qu'un rôle

nutritionnel puisque des hydrolysats de profil similaire obtenus par différentes enzymes n'induisaient pas le même effet sur la croissance et la survie des cellules.

II.2.4.6. Influence des hydrolysats en tant que substitut à certains éléments du milieu de base.

De par sa capacité à significativement promouvoir la croissance des cellules animales, l'hydrolysat soluble de DH 23,4 % obtenu avec la Pronase SG a été choisi comme substitut. Ce mélange peptidique a été ajouté à une concentration de 2 g/L dans un milieu dépourvu en certains composants du milieu de base : les éléments traces (sels), les TIB (mélange d'insuline, de transferrine et d'albumine), l'insuline ou la transferrine. Pour chaque essai, un témoin est réalisé dans les mêmes conditions mais sans le mélange peptidique. La figure II.11 présente les résultats obtenus.

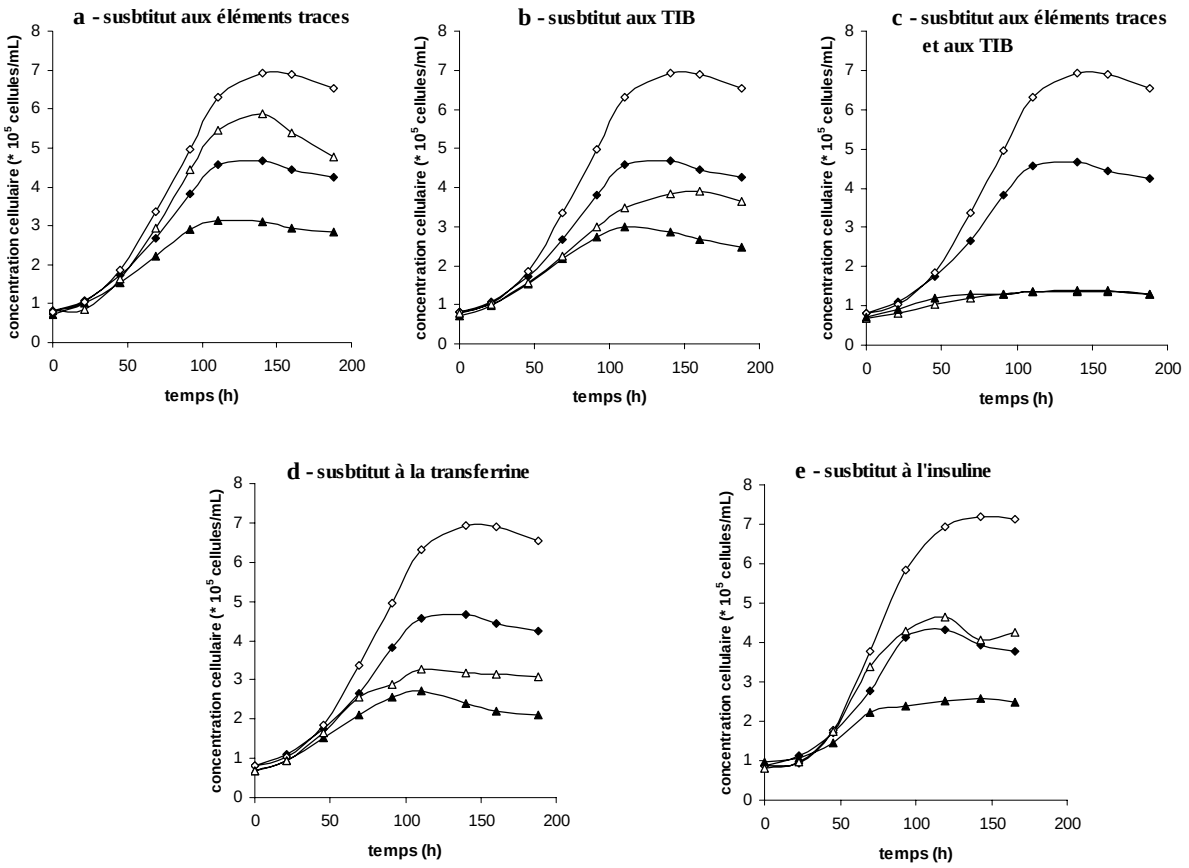


Figure II.11 : suivi par analyse d'images des cinétiques de croissance de cellules CHO C5 (dénombrement des cellules totales par le système Cellscreen). Effet de la supplémentation, par l'hydrolysat soluble obtenu avec la Pronase SG (DH 23,4 %), d'un milieu de culture dépourvu en certains constituant de base : (a) en éléments traces, (b) en TIB, (c) en éléments traces et en TIB, (d) en transferrine et (e) en insuline. Témoins positifs : (♦) milieu complet sans ajout du mélange peptidique, (◊) milieu complet en présence du mélange peptidique. Essais : (▲) milieu dépourvu en un composant de base et sans ajout du mélange peptidique, (Δ) milieu dépourvu en un composant de base et en présence du mélange peptidique.

Le mélange peptidique étudié se substitue aux éléments traces et à l'insuline (figures II.11.a et II.11.e). Cependant, il se substitue moins bien aux TIB et à la transferrine (figures II.11.b et II.11.d) puisqu'il ne permet pas d'atteindre la concentration cellulaire obtenue par la référence (en présence de ces composants). Enfin, en absence de TIB et d'éléments traces (figure II.11.c), la fraction peptidique seule ne permet pas de compenser la déplétion et entraîne un décès des cellules.

II.2.5. Récapitulatif de la comparaison des différentes protéases.

Ces premiers travaux ont permis de caractériser, dans des conditions opératoires définies, l'action hydrolytique de sept protéases commerciales sur un isolat de protéines de colza composé majoritairement de globulines. En particulier, nous avons mis en évidence que les cinétiques d'hydrolyse, la taille des peptides produits et l'activité biologique des hydrolysats sont influencées par la « spécificité » de l'enzyme.

Dans une première phase, nous avons montré que les protéases sont plus ou moins efficaces pour l'hydrolyse de l'isolat de globulines de colza, cette efficacité variant en fonction de la concentration initiale en enzyme. La Pronase SG est la protéase la plus efficace alors que la Lypaïne 6500 est, au contraire, la moins performante : pour cette raison, cette dernière a été éliminée de la suite de l'étude. L'évolution de la taille des peptides mise en évidence au cours de l'hydrolyse a permis de montrer que toutes les protéases possèdent un mécanisme de type zipper mais les subtilisines (Alcalase 2,4L, Orientase 90N et Espérase 7,5L) se distinguent par leur capacité à générer davantage de peptides intermédiaires (1–10 kDa) et moins de peptides inférieurs à 1000 Da comparativement aux protéases neutres (Pronase SG, Neutrase 0,8L et Prolyve BS). Toutefois, à un DH donné, les hydrolysats générés avec les différentes protéases possèdent la même solubilité et globalement la même composition en acides aminés.

Dans une seconde phase, la comparaison de l'activité biologique de divers hydrolysats solubles sur la croissance de cellules animales CHO C5 cultivées dans un milieu sans sérum a permis de montrer que les hydrolysats de DH élevés possédant plus de 70 % de peptides inférieurs à 1000 Da promeuvent fortement la croissance cellulaire et maintiennent cette croissance sur près de 200 h. D'une part, nous avons mis en évidence un effet dose de l'hydrolysat sur la cinétique de croissance des cellules. D'autre part, l'amélioration de la

croissance et de la survie des cellules dépend du type de protéase utilisée : les peptides n'auraient pas uniquement un rôle nutritionnel. Les hydrolysats les plus actifs sont ceux obtenus avec la Pronase SG et l'Alcalase 2,4L.
Enfin, nous avons montré que l'hydrolysat obtenu par la Pronase SG et caractérisé par un DH de 23,4 % se substitue bien à l'insuline et aux éléments traces mais moins bien aux TIB et à la transferrine.

Cependant, dans cette étude, toutes les hydrolyses ont été réalisées à un pH de 7,5 et à une température de 40 °C afin de s'affranchir de l'effet de ces paramètres sur les caractéristiques physico-chimiques du substrat. Ainsi, l'étude suivante vise à déterminer les conditions optimales de pH et de température des enzymes et à caractériser leur action hydrolytique dans de telles conditions afin de sélectionner celles produisant le plus de peptides inférieurs à 1000 Da.

II.3. COMPARAISON DE L'ACTION HYDROLYTIQUE DES PROTEASES DANS DES CONDITIONS OPTIMALES DE PH ET DE TEMPERATURE.

L'objectif principal de cette partie est de comparer les différentes protéases selon leur capacité à générer des petits peptides (< 1000 Da) dans des conditions de pH et de température leur étant les plus favorables.

II.3.1. Zone optimale de pH et de température pour la génération de petits et moyens peptides.

Cette étude consiste à déterminer les zones optimales de pH et de température des enzymes pour la production de petits et moyens peptides à partir de l'isolat de globulines. Les petits et moyens (peptides inférieurs à environ 5 kDa) sont, d'après la littérature, ceux qui sont le plus susceptible d'être biologiquement actifs.
Pour cela, nous avons modélisé l'activité protéolytique des enzymes en fonction du pH et de la température, l'activité protéolytique étant définie comme l'inverse de la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir une quantité donnée de petits et moyens peptides après hydrolyse de l'isolat de globulines pendant 10 mn. Le modèle utilisé est un polynôme du second degré qui nécessite, pour sa résolution, la détermination des valeurs de l'activité protéolytique pour 9 couples pH/température.

L'isolat de globulines a été hydrolysé pendant 10 mn, à 18,8 g/L, à différentes concentrations en enzyme et pour différents couples pH/température. La méthode choisie pour le suivi de l'étendue de l'hydrolyse est une méthode au TCA, méthode qui permet de quantifier les petits et moyens peptides. La concentration de TCA dans cette méthode est 0,3 M. Cette concentration permet de récupérer que les peptides inférieurs à 7000 Da de l'hydrolysat (non montré). Le degré d'hydrolyse obtenu après 10 mn par la méthode au TCA sera, par la suite, appelé DH_{TCA}. Ce DH_{TCA} est proportionnel à la quantité de peptides inférieurs à 7000 Da produits au cours de la réaction.

La figure II.12 présente, pour les différents couples pH/température, les valeurs de DH_{TCA} en fonction du ratio enzyme/substrat (exprimé en %, p/p ou v/p) ; les résultats sont représentés, à titre d'exemple, pour les trois enzymes Alcalase 2,4L, Pronase SG et Neutrase 0,8L.
Cette figure montre que plus la concentration initiale en enzyme augmente, plus le DH_{TCA} augmente à cause d'une dégradation plus poussée du substrat en petits et moyens peptides. De plus, quel que soit le couple pH/température, il existe une relation semi-logarithmique entre le DH_{TCA} et le ratio enzyme/substrat. Cette corrélation a été également mise en évidence pour les autres enzymes. Ces relations permettent de calculer précisément, pour un couple pH/température donné, la quantité d'enzyme nécessaire pour atteindre un DH_{TCA} donné. Ces valeurs expérimentales sont alors utilisées pour modéliser, en fonction du pH et de la température, l'activité protéolytique des protéases pour atteindre un DH_{TCA} donné.

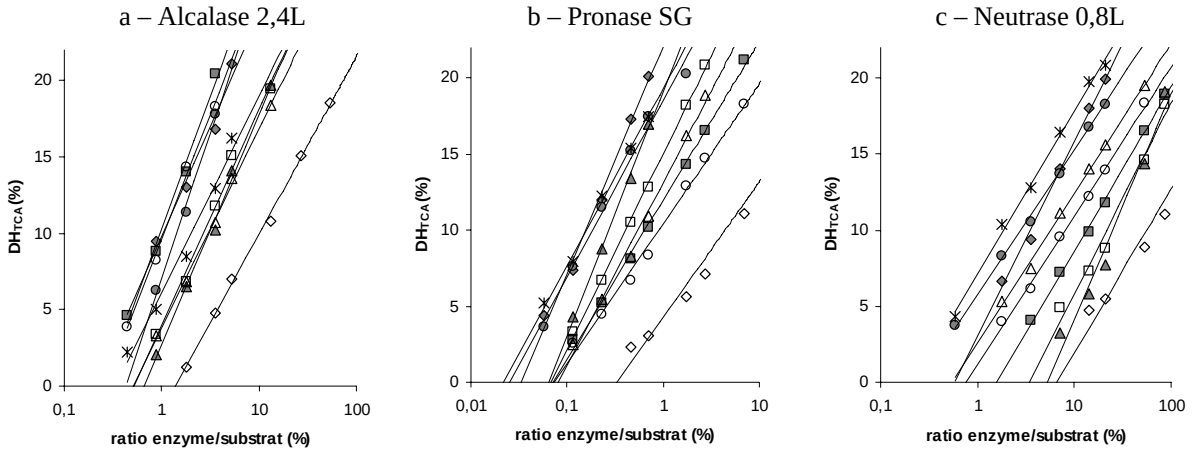


Figure II.12 : DH à 10 mn déterminé par une méthode au TCA (DH_{TCA}) pour différents ratios enzyme/protéine (%, mL ou g de protéase pour 100 g de protéines) et pour différents couple pH/température. Protéases : (a) Alcalase 2,4L, (b) Pronase SG et (c) Neutrase 0,8L. Couples pH/température : pour l'Alcalase 2,4L, (♦) pH 6 et 70 °C, (■) pH 8,5 et 70 °C, (▲) pH 10 et 70 °C, (●) pH 8,5 et 50 °C, (◊) pH 6 et 35 °C, (□) pH 8 et 36 °C, (Δ) pH 7 et 39 °C, (○) pH 7,5 et 60 °C, (*) pH 10 et 35 °C ; pour la Pronase SG, (♦) pH 7,5 et 60 °C, (■) pH 5 et 60 °C, (▲) pH 9 et 60 °C, (●) pH 7,5 et 40 °C, (◊) pH 5 et 25 °C, (□) pH 9 et 25 °C, (Δ) pH 7 et 26 °C, (○) pH 6 et 29 °C, (*) pH 6,5 et 50 °C.

Dans le cas où les peptides d'intérêt sont destinés à la supplémentation de milieu de culture pour cellules animales, il est apparu qu'il était préférable de trouver des conditions d'hydrolyse permettant d'obtenir un DH_{TCA} élevé. C'est pourquoi, nous avons défini une unité d'activité (U_{TCA}) comme étant la quantité d'enzyme (en g ou en mL suivant la formulation de la préparation enzymatique) pour obtenir un DH_{TCA} de 20 %. Le modèle empirique utilisé est l'équation polynômiale suivante :

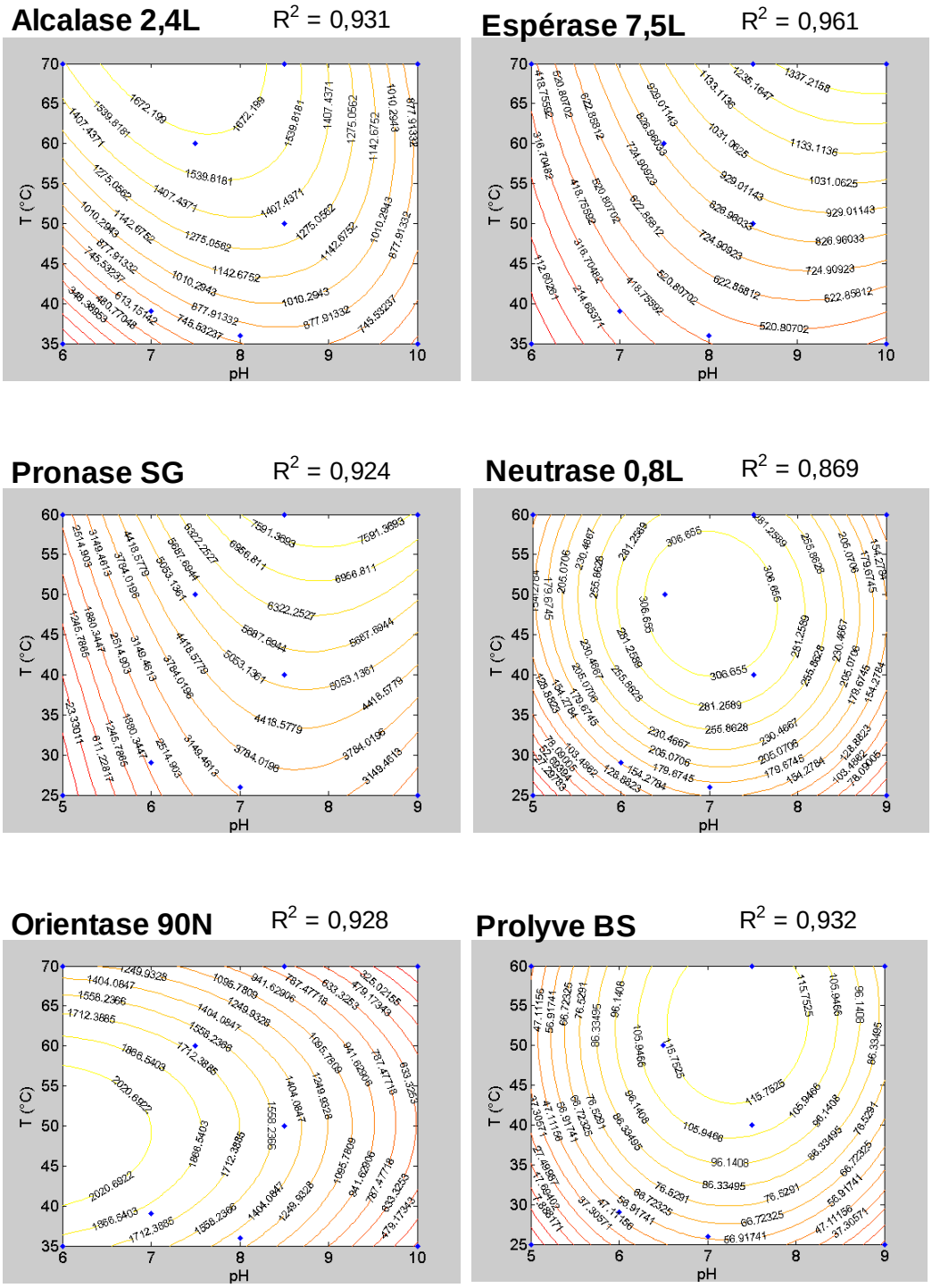
$AP = a_1 + (a_2 \times pH) + (a_3 \times T) + (a_4 \times pH \times T) + (a_5 \times pH^2) + (a_6 \times T^2)$, où $a_{1,...}a_6$, et $b_{1,...}b_6$ sont les constantes définissant les modèles, T est la température en °C et AP est l'activité protéolytique en unité arbitraire, U_{TCA}, par g ou mL d'enzyme.

Les courbes d'isoréponse de l'activité protéolytique, obtenues grâce aux modèles, sont présentées dans la figure II.13. Elles permettent d'identifier la zone de pH et de température où l'activité protéolytique de l'enzyme est la plus élevée, c'est-à-dire où l'enzyme est la plus active pour générer des petits et moyens peptides.

Notons, tout d'abord, que les coefficients de corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs modélisées sont acceptables puisqu'ils varient entre 0,87 et 0,96. Les tests de Student à 5 % d'erreur valident également les modèles.

La figure II.13 montre que l'activité protéolytique maximale et le couple pH/température lui correspondant varient significativement d'une protéase à l'autre. Caractérisée par une activité protéolytique maximale de 8180 U_{TCA}/g à pH 8 et 60 °C, la Pronase SG est la protéase la plus active pour générer des petits et moyens peptides, suivie dans l'ordre d'activité décroissante par l'Orientase 90N (2180 U_{TCA}/g à pH 6 et 50 °C), l'Alcalase 2,4L (1830 U_{TCA}/mL à pH 7,5 et 70 °C), l'Espérase 7,5L (1450 U_{TCA}/mL à pH 10 et 70 °C), la Neutrase 0,8L (330 U_{TCA}/mL à pH 7 et 48 °C) et la Prolyve BS (130 U_{TCA}/g à pH 7,4 et 52 °C). Il apparaît, ainsi, que les protéases à sérine (Orientase 90N, Alcalase 2,4L, Pronase SG et Espérase 7,5L) sont plus actives que les métalloprotéases. De par leurs très faibles activités protéolytiques, la Prolyve BS et la Neutrase 0,8L ne nous paraissent pas satisfaisantes. Nous avons décidé de ne pas poursuivre l'étude avec ces enzymes.

L'activité protéolytique maximale des protéases a été déterminée pour des réactions de 10 mn. Cette durée n'est cependant pas suffisante pour prendre en compte l'inactivation thermique de l'enzyme susceptible de se produire lors d'hydrolyses plus longues. C'est pourquoi, il est apparu important de déterminer les conditions optimales de pH et de température des enzymes pour des hydrolyses de plusieurs heures.



Alcalase 2,4L

a_1 = -15741
a_2 = 2924,8
a_3 = 183,50
a_4 = -10,030
a_5 = -150,95
a_6 = -0,7103

Espérase 7,5L

a_1 = -4595,7
a_2 = 1032,3
a_3 = -2,0508
a_4 = 4,0954
a_5 = -65,925
a_6 = -0,0855

Pronase SG

a_1 = -36547
a_2 = 10203
a_3 = -21,863
a_4 = 14,890
a_5 = -695,82
a_6 = 0,5129

Neutrase 0,8L

a_1 = -2779,9
a_2 = 654,32
a_3 = 33,437
a_4 = -0,4536
a_5 = -45,045
a_6 = -0,3098

Orientase 90N

a_1 = -4489,6
a_2 = 785,97
a_3 = 185,58
a_4 = 1,6580
a_5 = -78,507
a_6 = -2,0017

Prolyve BS

a_1 = -906,53
a_2 = 218,62
a_3 = 8,6443
a_4 = 0,1324
a_5 = -15,368
a_6 = -0,0905

Figure II.13 : modélisation de l'activité protéolytique des différentes protéases en fonction du pH et de la température lors de l'hydrolyse de l'isolat de globulines. Le modèle utilisé est un polynôme du second degré : $AP = a_1 + (a_2 \times pH) + (a_3 \times T) + (a_4 \times pH \times T) + (a_5 \times pH^2) + (a_6 \times T^2)$. Les valeurs des paramètres des modèles sont inscrites à droite des figures.

II.3.2. Détermination du pH optimal et de la température optimale des protéases pour des hydrolyses de longue durée.

II.3.2.1. Conditions optimales de pH et de températures des enzymes.

La détermination des conditions optimales de pH et de température des protéases s'appuie sur les résultats de la modélisation de l'activité protéolytique en fonction de ces variables. L'isolat de globulines (18,8 g/L) est hydrolysé, pendant 8,3 h, à différentes valeurs de pH et de température mais toujours à une même concentration initiale en protéase fixée en U_{TCA}/L. La concentration choisie a été fixée arbitrairement à 420 U_{TCA}/L afin d'atteindre un DH élevé après 8 h d'hydrolyse. Les DH finaux des hydrolyses sont alors comparés les uns par rapport aux autres : plus le DH final est faible, plus l'enzyme a perdu son activité au cours de l'hydrolyse. Ainsi, les conditions optimales de pH et de température des enzymes sont celles qui correspondent au DH final le plus élevé.

Les hydrolyses sont conduites par la méthode du pH-Stat dans un réacteur discontinu d'un volume de 100 mL. Les hydrolyses sont réalisées à différents couples pH/température. Ceux-ci sont choisis en fixant d'abord la température et en déterminant, ensuite, grâce aux courbes d'isoréponse obtenues précédemment, le pH qui donne la meilleure activité. Les valeurs de température sont, d'expérience en expérience, de plus en plus faibles afin de bien cerner les phénomènes d'inactivation enzymatique et, en particulier, de dénaturation thermique des enzymes. Les résultats sont présentés dans le tableau II.6.

Tableau II.6 : détermination des conditions optimales de pH et de température des protéases. DH obtenu après 8,3 h pour des hydrolyses conduites à différents couples pH/température, pour une concentration initiale en enzyme de 416 U_{TCA}/L et pour une concentration initiale en substrat de 18,8 g/L.

Alcalase 2,4L		**Espérase 7,5L**		**Pronase SG**		**Orientase 90N**	
Température et pH	DH (%)	Température et pH	DH (%)	Température et pH	DH (%)	Température et pH	DH (%)
70 °C, pH 8,5	6,9	70 °C, pH 8,5	10,6	47 °C, pH 7,7	13,3	55 °C, pH 7	16,8
65 °C, pH 7,5	14,0	60 °C, pH 9	16,9	42 °C, pH 7,7	15,3	45 °C, pH 7,5	18,0
60 °C, pH 7,5	17,3	55 °C, pH 9,5	19,4	37 °C, pH 7,7	17,3	40 °C, pH 7,5	18,6
55 °C, pH 7,7	18,1	50 °C, pH 9,5	19,4	32 °C, pH 7,7	17,3	35 °C, pH 7,7	18,0
50 °C, pH 8	18,5						

D'après le tableau II.6, une diminution de la température de l'hydrolyse s'accompagne d'un accroissement du DH final. Il existe cependant une température seuil à partir de laquelle aucune diminution significative du DH final n'est observée ; cette température correspondrait à la température optimale de l'enzyme. En effet, la diminution du DH lorsque la température

augmente montrerait que les protéases perdent progressivement leur activité par des phénomènes de dénaturation thermique. Les conditions optimales de pH et de température de chaque protéase pour la génération de petits et moyens peptides ainsi que leur activité protéolytique dans ces conditions sont récapitulées dans le tableau II.7.

Tableau II.7 : pH optimal (pHo) et température optimale (To) des protéases pour l'hydrolyse d'un isolat de protéines de tourteaux de colza. L'activité protéolytique dans les conditions optimales de pH et de température a été calculée en U_{TCA}/mL ou en U_{TCA}/g d'enzyme.

Protéase	**pHo**	**To**	**Couple pHo / To choisi**	**Activité protéolytique (U_{TCA}/mL ou U_{TCA}/g) au couple pHo / To**
Alcalase 2,4L	7,7 – 8	50 – 55	8 / 50	1380
Espérase 7,5L	9,5	50 – 55	9,5 / 55	1030
Pronase SG	7,7	32 – 37	7,7 / 37	4900
Orientase 90N	7,5	40 – 45	7,5 / 40	1710

Les conditions optimales de pH et de température trouvées dans cette étude sont proches ou similaires de celles conseillées par les fournisseurs ou de celles utilisées dans la littérature. Seul le pH optimal de la Pronase SG est différent de celui indiqué par le fournisseur. En effet, ce dernier conseille un pH de 8,8 alors que nous trouvons un pH optimal de 7,7 (Yoshida *et al.*, 1988).

Enfin, d'après le tableau II.7, dans des conditions optimales de pH et de température, la Pronase SG est la protéase la plus active (4900 U_{TCA}/g) suivie de l'Orientase 90N (1710 U_{TCA}/g), de l'Alcalase 2,4L (1380 U_{TCA}/mL) et de l'Espérase 7,5L (1030 U_{TCA}/mL).

Les conditions optimales de pH et de température pour la génération des petits et moyens peptides ont été identifiées pour les protéases sélectionnées. Toutefois, afin de caractériser plus précisément la nature des peptides générés, les hydrolysats ont été analysés par CLHP.

II.3.2.2. Caractérisation des hydrolysats par CLHP-ET et CLHP-PI.

Les hydrolysats précédents, obtenus dans des conditions optimales et caractérisés par des DH variant entre 17,3 et 19,4 % selon l'enzyme, ont été analysés par CLHP-ET et par CHLP-PI (figure II.16).

Les profils chromatographiques obtenus par les deux techniques analytiques diffèrent fortement suivant le type de protéase utilisé, ce qui permet de suggérer des mélanges de peptides de nature différente.

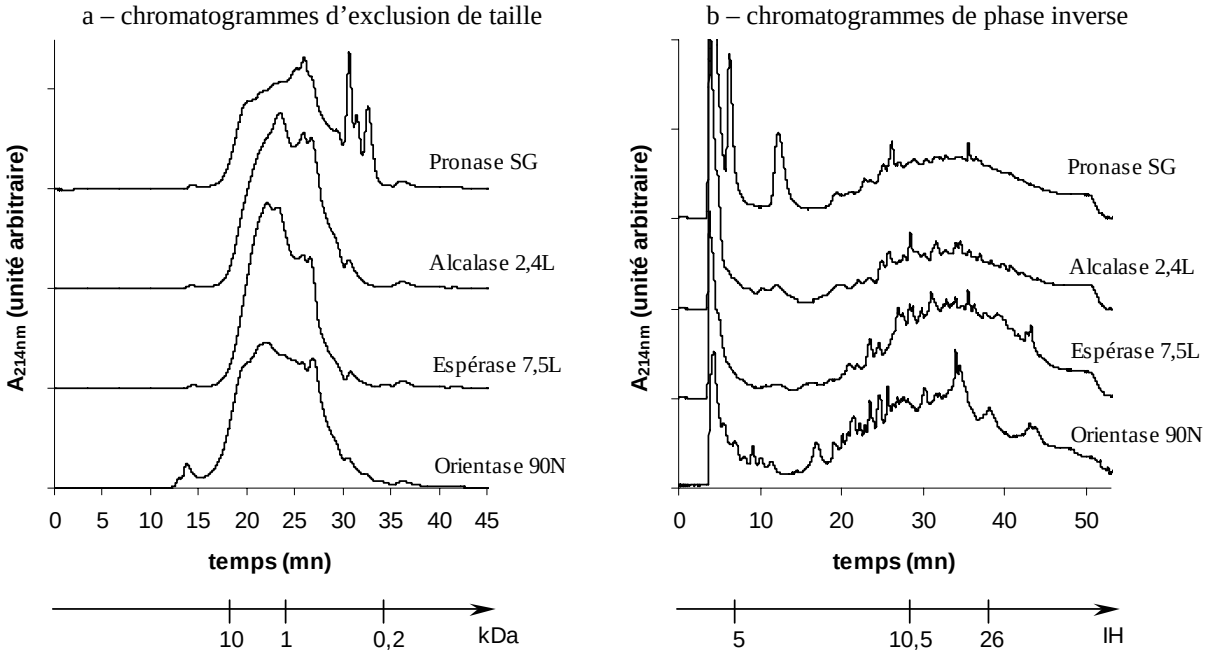


Figure II.16 : profils chromatographiques d'hydrolysats obtenus par (a) chromatographie d'exclusion de taille (colonne Superdex Peptide H/R 10/30) et (b) par chromatographie en phase inverse (colonne C_{18} Prosphere 300Å). Les hydrolysats analysés sont ceux obtenus par hydrolyse de l'isolat de globulines par différentes protéases. Conditions réactionnelles : So = 18,8 g/L, Eo = 416 U_{TCA}/L, durée = 8,3 h ; Alcalase 2,4L : pH 8 et 50 °C (DH = 18,5 %), Espérase 7,5L : pH 9,5 et 55 °C (DH = 19,4 %), Pronase SG : pH 7,7 et 37 °C (DH = 17,3 %), Orientase 90N : pH 7,5 et 40 °C (DH = 18,6 %). IH : indice d'hydrophobie.

Effectivement, d'après la distribution de taille moléculaire des mélanges de peptides et leur répartition d'hydrophobie (respectivement tableaux II.8 et II.9) :

- la Pronase SG a généré un hydrolysat essentiellement constitué de peptides inférieurs à 1 kDa (62 %) et de nature hydrophile ou amphiphile (66 %) ;
- l'hydrolysat obtenu par l'Alcalase 2,4L est principalement composé de peptides inférieurs à 3 kDa (73 %) de nature amphiphile ou hydrophobe (respectivement 35 % et 33 %) mais aussi de nature hydrophile (24 %) ;
- comparativement aux autres hydrolysats, l'Espérase 7,5L a produit un hydrolysat caractérisé par une forte proportion en peptides intermédiaires de taille moléculaire comprise entre 1 et 10 kDa (26 %) et une forte proportion de peptides hydrophobes ou très hydrophobes (60 %) ;
- l'hydrolysat produit par l'Orientase 90N est remarquable par sa proportion élevée en polypeptides supérieurs à 10 kDa (21 %), par sa faible proportion en peptides hydrophiles (9 %) et par sa proportion relativement élevée en peptides amphiphiles ou hydrophobes (respectivement 39 % et 33 %).

Tableau II.8 : distribution de taille moléculaire des hydrolysats obtenus par hydrolyse de l'isolat de globulines avec différentes protéases ajoutées à 416 U_{TCA}/L dans le milieu réactionnel. Conditions réactionnelles : So = 18,8 g/L, durée = 8,3 h ; Alcalase 2,4L : pH 8 et 50 °C, Espérase 7,5L : pH 9,5 et 55 °C, Pronase SG : pH 7,7 et 37 °C, Orientase 90N : pH 7,5 et 40 °C.

	Proportion des peptides (%) dont la taille moléculaire est :			
hydrolysat	**> 10 kDa**	**3 – 10 kDa**	**1 – 3 kDa**	**< 1 kDa**
Alcalase 2,4L, DH = 18,5 %	9,7	17,3	20,7	52,3
Espérase 7,5L, DH = 19,4 %	10,7	22,1	23,4	43,8
Pronase SG, DH = 17,3 %	11,4	13,2	13,9	61,5
Orientase 90N, DH = 18,6 %	21,0	17,2	16,3	45,5

Tableau II.9 : répartition d'hydrophobie des hydrolysats obtenus par hydrolyse de l'isolat de globulines avec différentes protéases ajoutées à 416 U_{TCA}/L dans le milieu réactionnel. Conditions réactionnelles : So = 18,8 g/L, durée = 8,3 h ; Alcalase 2,4L : pH 8 et 50 °C, Espérase 7,5L : pH 9,5 et 55 °C, Pronase SG : pH 7,7 et 37 °C, Orientase 90N : pH 7,5 et 40 °C.

	Proportion des peptides (%) dont l'indice d'hydrophobie est :			
	< 5	**5 – 10,5**	**10,5 – 26**	**> 26**
Nature hydrophile/hydrophobe des peptides	hydrophile	amphiphile	hydrophobe	très hydrophobe
Alcalase 2,4L, DH = 18,5 %	24,4	34,6	33,0	8,0
Espérase 7,5L, DH = 19,4 %	11,9	28,1	39,6	20,4
Pronase SG, DH = 17,3 %	28,9	37,3	25,2	8,6
Orientase 90N, DH = 18,6 %	9,3	38,7	33,4	18,6

Le choix de l'enzyme dans un procédé d'hydrolyse peut être orienté par sa capacité à produire des peptides de propriétés particulières. Par exemple, de par leur capacité à générer des hydrolysats composés de grands peptides ou polypeptides, de nature amphiphile et hydrophobe, l'Orientase 90N et l'Espérase 7,5L sont plus susceptibles de produire des hydrolysats à propriétés fonctionnelles. Inversement, la Pronase SG et l'Alcalase 2,4L génèrent davantage de petits peptides (< 1 kDa) de nature hydrophile ou amphiphile ; elles seraient donc plus susceptibles de produire des hydrolysats à propriétés nutritionnelles ou hypoallergéniques, ou de générer des peptides ayant un intérêt notamment comme additif dans des milieux de culture pour cellules animales.

Il s'avère effectivement que les hydrolysats de DH élevé obtenus avec la Pronase SG (DH = 21 %) à pH 7,7 et 37 °C, ou ceux obtenus avec l'Alcalase 2,4L (DH = 26 %) à pH 8 et 50 °C, permettent de promouvoir significativement la croissance de cellules CHO C5 lorsque ces derniers sont additionnés à 2 g/L dans le milieu de culture sans sérum (résultats non montrés). En effet, après 180 h de culture, la densité cellulaire dans les milieux supplémentés en hydrolysat augmente, d'après l'analyse d'images, d'environ 75 % par rapport à la densité cellulaire de la culture de référence.

II.3.3. Récapitulatif de la comparaison des enzymes dans des conditions optimales de pH et de température.

Considérant l'hydrolyse de l'isolat de globulines, les protéases ont été comparées selon leur capacité à générer des petits et moyens peptides (< 7000 Da) dans les conditions de pH et de température leur étant les plus favorables. Ce travail a permis :

- de définir les conditions optimales de pH et de température pour la génération de petits et moyens peptides ;
- de montrer que la Prolyve BS et la Neutrase 0,8L possèdent, comparativement aux autres enzymes, une faible activité protéolytique maximale pour la production de ce type de peptides ;
- de montrer que la Pronase SG et l'Alcalase 2,4L sont les protéases qui produisent le plus de petits peptides de nature hydrophile alors que l'Espérase 7,5L et l'Orientase 90N génèrent des peptides plus longs et de nature plus hydrophobe. Ainsi, selon l'application recherchée pour l'hydrolysat, le choix de l'enzyme peut être plus ou moins orienté vers l'une des enzymes. L'Espérase 7,5L et l'Orientase 90N pourraient être les protéases les plus appropriées pour la génération d'hydrolysats à propriétés fonctionnelles alors que la Pronase SG et l'Alcalase 2,4L sont les protéases les plus adéquates pour la production d'hydrolysats promouvant la croissance de cellules animales cultivées dans un milieu sans sérum.

II.4. CONCLUSION.

Ces travaux ont permis de caractériser et de comparer l'action hydrolytique de sept protéases commerciales sur l'isolat de globulines.

Dans une première phase, considérant l'hydrolyse des globulines dans des conditions de pH et de température contraintes, nous avons montré que la spécificité des enzymes influence les cinétiques d'hydrolyse, la taille des peptides produits et l'activité biologique des hydrolysats. En effet, les enzymes se distinguent par leur activité protéolytique en UA/g ou UA/mL, par leur efficacité d'hydrolyse, par leur mécanisme zipper plus ou moins prépondérant, par leur coût pour obtenir un DH donné et par la nature des peptides qu'elles génèrent. Pour ce dernier cas, ceci a été mis en évidence en déterminant l'influence des hydrolysats sur la croissance de cellules animales cultivées dans un milieu sans sérum. En effet, pour une même répartition de

taille des peptides, certains hydrolysats favorisent mieux que d'autres la croissance de cellules CHO. Le tableau II.10 synthétise l'ensemble de ces résultats.

Tableau II.10 : tableau synthétisant les résultats concernant l'action hydrolytique des protéases sur l'isolat de globulines. Performance : +++ : excellente, ++ : bonne, + : médiocre, - : mauvaise.

	Prolyve BS	Alcalase 2,4L	Orientase 90N	Pronase SG	Lypaïne 6500	Neutrase 0,8L	Espérase 7,5L
Activité protéolytique en UA/g ou UA/mL	+	++	++	+++	-	+	++
Efficacité hydrolytique vis-à-vis des globulines	++	+	++	+++	-	++	+
Prépondérance du mécanisme zipper	++	+	+	++	n.d.	++	+
Coût des protéases	+	+++	+++	-	n.d.	++	++
Influence des hydrolysats sur la croissance de cellules animales	n.d.	+++	++	+++	n.d.	+	++

n.d. : non déterminé.

L'étude a également montré que les hydrolysats majoritairement composés de peptides inférieurs à 1000 Da (à plus de 70 %) sont ceux qui améliorent le plus significativement la croissance des cellules animales. Il existerait un effet dose de ces peptides puisque la croissance des cellules animales est plus ou moins lente et la densité cellulaire maximale atteinte est plus ou moins importante selon la concentration de l'hydrolysat additionné dans le milieu de culture. De plus, en comparaison à un hydrolysat de blé commercialisé pour ces propriétés activatrices de la croissance de cellules animales, certains hydrolysats de colza paraissent plus actifs mais ces résultats préliminaires sont à valider sur plusieurs lignées cellulaires.

Dans une seconde phase, les enzymes ont tout d'abord été comparées sur leur capacité à générer des petits et moyens peptides (< 7000 Da) dans les conditions de pH et de température leur étant les plus favorables ; considérant que les petits et moyens peptides sont les peptides les plus susceptibles d'être actifs.

Les enzymes les plus actives pour générer de tels peptides sont dans l'ordre décroissant : la Pronase SG, l'Orientase 90N, l'Alcalase 2,4L et l'Espérase 7,5L. Toutefois, à un DH donné, la Pronase SG et l'Alcalase 2,4L produisent plus de peptides inférieurs à 1000 Da et de nature hydrophile que l'Espérase 7,5L et l'Orientase 90N. Ainsi, selon l'application recherchée des peptides, le choix des protéases peut s'orienter vers l'une ou l'autre des protéases.

Très active pour la génération de peptides inférieurs à 1000 Da et capables de générer des hydrolysats promouvant la croissance de cellules animales, l'Alcalase 2,4L et la Pronase SG sont les deux protéases choisies pour la suite de ce travail.

III. ETUDE CINETIQUE ET MODELISATION DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE D'ISOLATS DE PROTEINES DE COLZA.

III.1. INTRODUCTION.

L'objectif de cette troisième partie est de prédire le comportement des systèmes Alcalase 2,4L/Globulines, Pronase SG/Globulines et Alcalase 2,4L/Albumines d'un point de vue cinétique et d'un point de vue « moléculaire ».

Dans une première phase, des conditions de mise en œuvre de procédé d'hydrolyse seront proposés pour les différents systèmes enzyme/substrat en étudiant l'influence des paramètres d'hydrolyse (la concentration initiale en protéase, Eo, la concentration initiale en protéines, So, la température, T, et le pH), d'une part, sur la cinétique d'hydrolyse et, d'autre part, sur la nature des peptides produits. Pour cela, l'étendue de l'hydrolyse sera suivie par la méthode du pH-Stat et les hydrolysats seront caractérisés par différentes techniques analytiques : chromatographie d'exclusion de taille et chromatographie en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse. Les relations entre le degré d'hydrolyse et la nature des peptides générés aux différentes conditions opératoires seront recherchées.

Dans une seconde phase, la construction de modèles phénoménologiques, permettant de simuler l'hydrolyse enzymatique des différents systèmes enzyme/substrat en réacteur discontinu et pour différentes conditions opératoires, sera envisagée. Pour cela, les phénomènes susceptibles de limiter la réaction d'hydrolyse tels que les phénomènes d'inactivation ou d'inhibition des enzymes ou la modification de la nature du substrat avec l'avancement de la réaction, seront identifiés. Des hypothèses concernant le mécanisme des processus de l'hydrolyse seront alors formulées afin de construire un modèle fondé sur les base du schéma réactionnel de Michaelis-Menten.

III.2. INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES SUR L'HYDROLYSE DE PROTEINES DE COLZA.

III.2.1. Influence des conditions opératoires sur la cinétique d'hydrolyse.

III.2.1.1. Influence de Eo et de So.

La figure III.1 présente les cinétiques d'hydrolyse obtenues à différentes concentrations initiales en substrat (So) et à différentes concentrations initiales en enzyme (Eo) pour les trois systèmes enzyme/substrat définis précédemment.

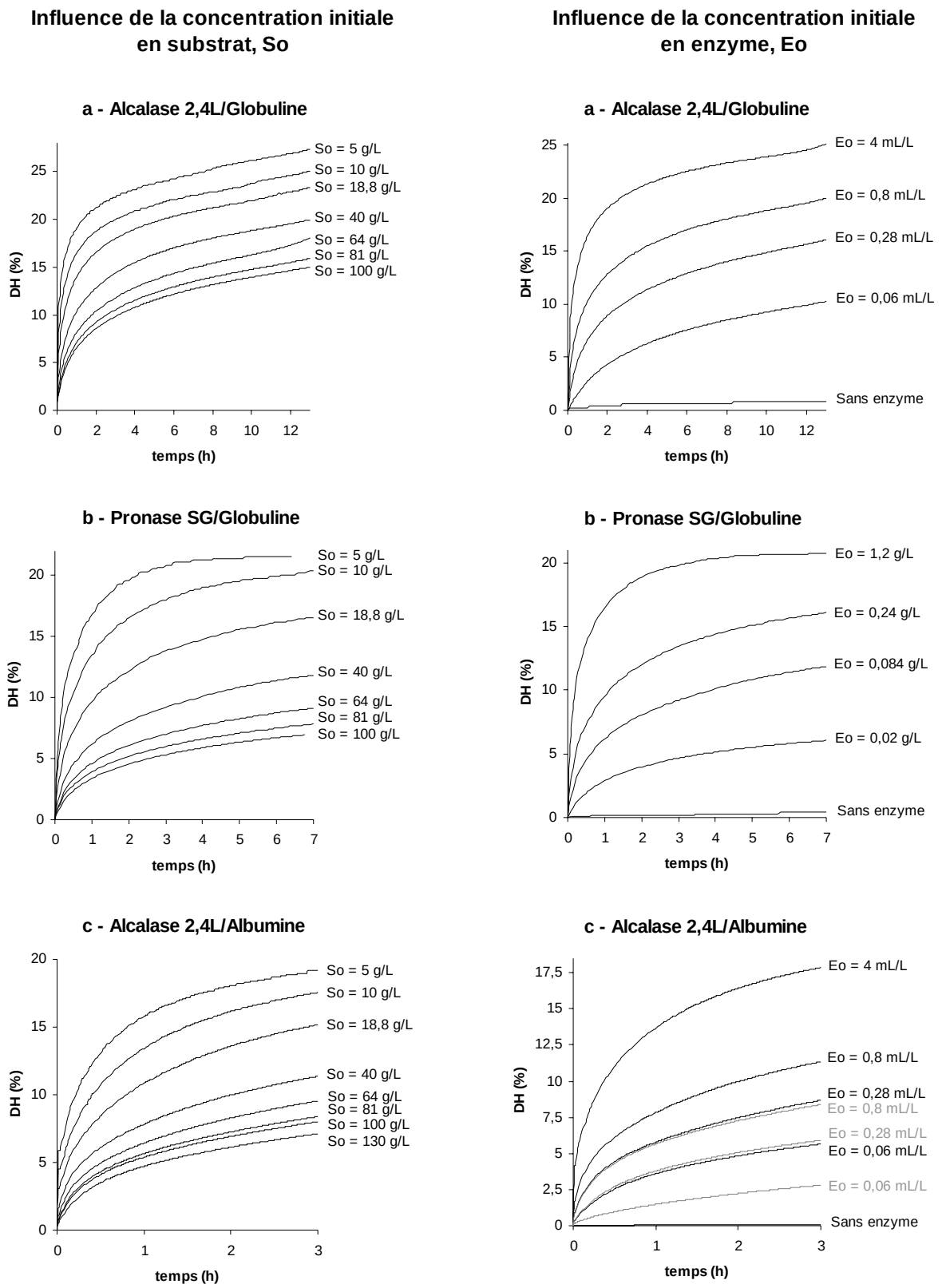


Figure III.1 : influence de la concentration initiale en protéines (So) et en enzyme (Eo) sur les cinétiques d'hydrolyse des différents systèmes enzyme/substrat : (a) Alcalase 2,4L/Globuline, (b) Pronase SG/Globuline et (c) Alcalase 2,4L/Albumine. Conditions réactionnelles pour le système Alcalase 2,4L/Globuline : pH = 8, T = 50 °C, Eo = 0,8 mL/L ou So = 40 g/L, durée = 13 h. Conditions réactionnelles pour le système Pronase SG/Globuline : pH = 7,7, T = 37 °C, Eo = 0,084 g/L ou So = 40 g/L et durée = 7 h. Conditions réactionnelles pour le système Alcalase 2,4L/Albumine : pH 8, T = 50 °C, Eo = 0,8 mL/L ou (—) : So = 40 g/L et (—) : So = 81 g/L, durée = 3 h.

Cette figure montre que, quels que soient le système enzyme/substrat et les concentrations initiales en substrat et en enzyme, les courbes d'hydrolyse sont caractérisées par une vitesse d'hydrolyse très rapide initialement et d'une diminution progressive de cette vitesse. Ce comportement est similaire à celui reporté pour l'hydrolyse d'autres protéines végétales comme celles de tournesol (Villanueva *et al.*, 1999), de pois chiche (Márquez et Fernández, 1998), de feuille (Prevot-D'Alvise *et al.*, 2004), de blé (Masson *et al.*, 1986) et de soja (Adler-Nissen, 1978).

Cette diminution progressive de la vitesse d'hydrolyse peut être attribuée à l'un ou plusieurs des phénomènes suivants : une limitation du nombre de liaisons peptidiques disponibles pour l'hydrolyse, une inhibition de l'enzyme par le substrat ou des produits d'hydrolyse, ou une inactivation de l'enzyme (dénaturation thermique ou autolyse).

Les courbes d'hydrolyse ont une allure asymptotique. En général, pour décrire des systèmes simples, le schéma réactionnel classique de Michaelis-Menten est utilisé :

$$\mathbf{E + S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathbf{ES} \xrightarrow{k_2} \mathbf{E + P}$$

E : enzyme active
S : substrat
ES : complexe enzyme-substrat
P : produit
k_1, k_{-1}, k_2 : constantes de vitesse

La figure III.1 met en évidence, pour les trois systèmes enzyme/substrat étudiés, que :

- à Eo, T et pH constants, le DH diminue avec l'augmentation de So,
- à So, T et pH constants, le DH augmente avec l'accroissement de Eo.

Des résultats similaires ont été observés dans la majorité des travaux portant sur des études cinétiques de protéolyse enzymatique. Les cinétiques témoins, en absence d'enzyme, montrent que la dégradation chimique est négligeable pour tous les systèmes étudiés (DH < 0,8 % à 13 h d'hydrolyse pour une concentration initiale en substrat de 40 g/L).

La figure III.1 montre également que, pour obtenir des DH élevés (> 20 %), il est nécessaire soit de travailler à des Eo élevés, soit à des So faibles. Dans de telles conditions, une valeur maximale de DH de 21,5 % est même atteinte pour le système avec la Pronase SG. Toutefois, pour les autres systèmes avec l'Alcalase 2,4L, le DH maximal n'est pas obtenu. Ceci peut s'expliquer par le large spectre d'action de l'Alcalase 2,4L.

** Constantes cinétiques des systèmes enzyme/substrat.*

Afin de caractériser plus précisément l'influence de So et de Eo sur les cinétiques d'hydrolyse, la vitesse initiale, Vo, a été tracée soit en fonction de So (figure III.2.a), soit en fonction de Eo (figure III.2.b).

D'après la figure III.2.a, l'augmentation de So conduit à une hausse de la vitesse initiale Vo vers une valeur limite qui correspondrait à la vitesse maximale apparente, Vm, de l'hydrolyse. Aucune diminution de Vo pour des concentrations élevées de So (100 g/L pour les globulines qui correspond à leur valeur limite de solubilisation et 130 g/L pour les albumines) n'est observée. Ainsi, il apparaît que les protéases ne sont pas inhibées par excès de substrat lorsque les concentrations initiales de ce dernier sont inférieures à 100 – 130 g/L.

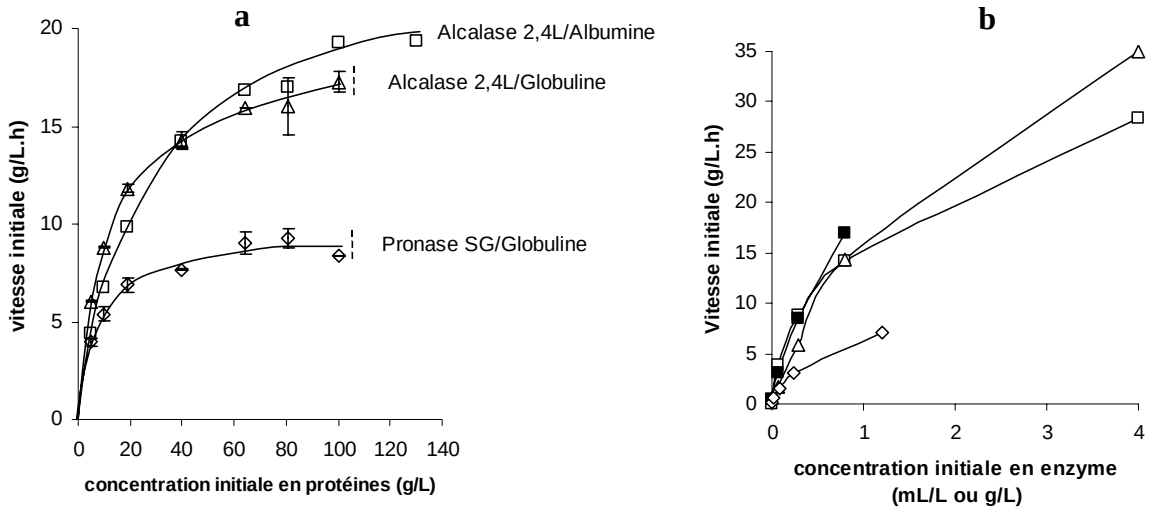


Figure III.2 : (a) évolution de la vitesse initiale, Vo, en fonction de la concentration initiale en protéines, So, pour les systèmes enzyme/substrat suivants : (Δ) Alcalase 2,4L / Globuline (pH = 8, T = 50 °C et Eo = 0,8 mL/L), (◊) Pronase SG / Globuline (pH = 7.7, T = 37 °C et Eo = 0,084 g/L), (□) Alcalase 2,4L / Albumine (pH = 8, T = 50 °C et Eo = 0,8 mL/L). (b) évolution de la vitesse initiale, Vo, en fonction de la concentration initiale en enzyme, Eo, pour les systèmes enzyme/substrat suivants : (Δ) Alcalase 2,4L / Globuline (pH = 8, T = 50 °C et So = 40 g/L), (◊) Pronase SG / Globuline (pH = 7.7, T = 37 °C et So = 40 g/L), (□) Alcalase 2,4L / Albumine (pH = 8, T = 50 °C et So = 40 g/L), (■) Alcalase 2,4L / Albumine (pH = 8, T = 50 °C et So = 81 g/L).

La vitesse maximale apparente, Vm, et la constante de Michaelis-Menten apparente, Km, caractéristiques de chaque système enzyme/substrat ainsi que l'efficacité catalytique des enzymes, k_2/Km, ont alors été déterminées (tableau III.1).

Lors de l'hydrolyse de l'isolat de globulines, il apparaît que l'efficacité catalytique de la Pronase SG (16 L/g.h) est environ 7 fois plus élevée que celle obtenue avec l'Alcalase 2,4L (2,2 L/g.h). Ceci est dû à la valeur de la constante de vitesse, k_2, de la Pronase SG qui est

environ 50 fois plus importante que celle de l'Alcalase 2,4L, alors que ces deux enzymes montrent une affinité similaire pour le substrat.

L'Alcalase 2,4L hydrolyse plus efficacement les globulines (k_2/Km = 2,2 L/g.h) que les albumines (k_2/Km = 1,3 L/g.h) à cause d'une affinité deux fois plus faible de l'enzyme envers les albumines comparées aux globulines, mais d'une constante de vitesse d'hydrolyse k_2 similaire pour les deux substrats.

Tableau III.1 : valeurs estimées de la vitesse maximale apparente, Vm, de la constante de vitesse apparente, k_2, de la constante de Michaelis apparente, Km, et de l'efficacité catalytique, k_2/Km, caractéristiques de chaque système enzyme/substrat étudié.

Système enzyme/substrat	**Vm (g/L.h)**	**k_2 (h^{-1})**	**Km (g/L)**	**k_2/Km (L/g.h)**
Alcalase 2,4L / Globuline	18,7 ± 0,7	23,4 ± 0,9	10,7 ± 0,7	2,2 ± 0,1
Pronase SG / Globuline	9,4 ± 0,1	112,3 ± 1,0	7,0 ± 0,4	16,0 ± 0,7
Alcalase 2,4L / Albumine	21,3	26,7	20,0	1,34

Si l'on considère que l'enzyme puisse être saturée par le substrat pour des So supérieurs à quatre fois le Km alors, aux Eo de l'étude (0,8 mL/L pour l'Alcalase 2,4L et 0,084 g/L pour la Pronase SG), les enzymes sont saturées par le substrat à partir de 40 g/L pour les systèmes avec l'isolat de globulines et à partir de 80 g/L pour le système avec l'isolat d'albumines. Ainsi, pour des ratios Eo/So inférieurs à 1,3, à 0,2 et à 1 % respectivement pour les systèmes Alcalase 2,4L/Globuline, Pronase SG/Globuline et Alcalase 2,4L/Albumine, l'enzyme est saturée par le substrat. Des valeurs similaires sont également trouvées à partir de la figure III.2.b ; en effet, Vo n'est plus proportionnelle à Eo lorsque l'enzyme n'est plus saturée par le substrat.

III.2.1.2. Influence de la température.

** Influence de la température sur les cinétiques d'hydrolyse.*

La température est un paramètre qui a une double influence sur les enzymes : une augmentation de la température augmente l'activité protéolytique de l'enzyme mais une température trop élevée peut, à l'inverse, diminuer son activité suite à une dénaturation réversible ou irréversible de cette dernière. Dans les procédés industriels, il existe souvent un compromis entre la vitesse de catalyse et l'inactivation de la protéase.

La figure III.3 rassemble les cinétiques d'hydrolyse de l'isolat de globulines par l'Alcalase 2,4L ou par la Pronase SG, à différentes températures mais pour des So, Eo et pH constants. Il

est observé que la vitesse réactionnelle augmente avec la température jusqu'à une température seuil au-delà de laquelle elle diminue rapidement. Cette diminution de la vitesse d'hydrolyse serait liée à une dénaturation thermique de plus en plus prononcée de l'enzyme. Après 7 h d'hydrolyse, la température optimale pour l'Alcalase 2,4L est de 50 °C alors que celle pour la Pronase SG est de 37 °C (entre 32 et 42 °C).

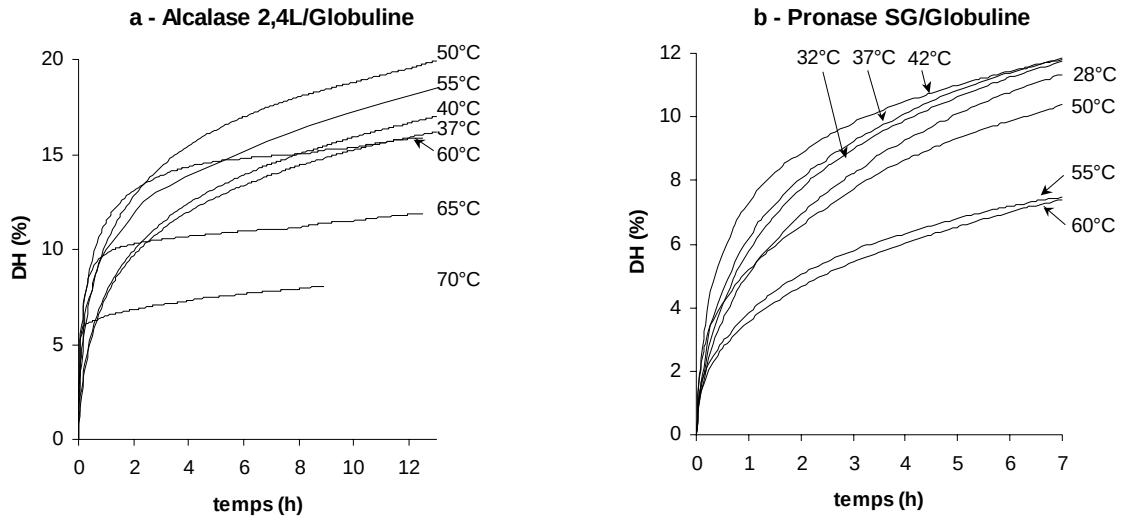


Figure III.3 : influence de la température (T) sur les cinétiques d'hydrolyse de différents systèmes enzyme/substrat : (a) système Alcalase 2,4L/Globuline, (b) système Pronase SG/Globuline. Conditions réactionnelles pour le système Alcalase 2,4L/Globuline : pH = 8, So = 40 g/L, Eo = 0,8 mL/L et durée = 13 h. Conditions réactionnelles pour le système Pronase SG/Globuline : pH = 7,7, So = 40 g/L, Eo = 0,084 g/L et durée = 7 h.

L'effet de la température sur les enzymes a été évalué en déterminant leur énergie d'activation (Ea) et leur énergie d'activation de dénaturation (Ed).

** Energie d'activation des enzymes.*

La détermination de l'énergie d'activation des enzymes a été réalisée en considérant qu'aux temps initiaux, leur dénaturation thermique est négligeable, et, en traçant les représentations logarithmiques des vitesses initiales, Vo, en fonction de l'inverse de la température (figure III.4). Selon les résultats observés, il n'apparaît pas de différences significatives entre les deux enzymes. Ainsi, d'après la loi d'Arrhénius, une valeur de $18,4 \times 10^3$ J/mol a été trouvée pour les deux enzymes. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles trouvées dans la littérature, comprises entre $4,9 \times 10^3$ J/mol et 50×10^3 J/mol en fonction des conditions de mise en œuvre de l'Alcalase (type de protéines, ratio Eo/So) (Márquez et Vázquez, 1999).

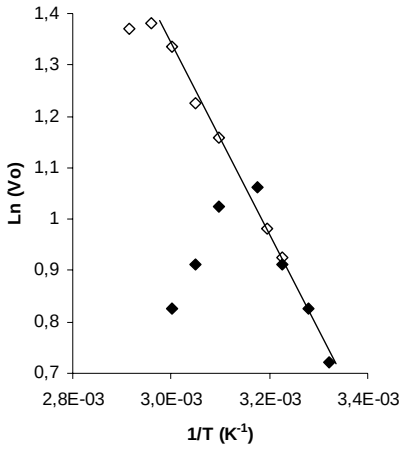


Figure III.4 : détermination des paramètres concernant l'activation thermique des enzymes lors de l'hydrolyse de l'isolat de globulines. Protéases : (◊) Alcalase 2,4L, (♦) Pronase SG. Conditions réactionnelles : pour l'Alcalase 2,4L : Eo = 0,8 mL/L, So = 40 g/L, pH = 8 ; pour la Pronase SG : Eo = 0,084 g/L, So = 40 g/L, pH = 7,7.

** Energie d'activation de dénaturation des enzymes.*

L'énergie d'activation de dénaturation des enzymes a été déterminée en étudiant leur dénaturation thermique. Elle a été observée en fonction du temps d'incubation à différentes températures comprises entre 37 °C et 65 °C, en mesurant l'activité résiduelle des solutions enzymatiques (figure III.5).

Alors qu'à 37 °C, la Pronase SG ne subit aucune altération après 2 h d'exposition, l'activité résiduelle diminue de plus en plus rapidement quand la température d'incubation augmente au-delà de 37 °C (figure III.5.a). Des résultats similaires sont observés avec l'Alcalase 2,4L mais elle ne commence à perdre son activité que pour des températures supérieures à 45 °C. Des courbes très similaires ont été obtenues par Ferreira *et al.* (2003) concernant l'évolution de l'activité résiduelle de l'Alcalase 2,4L à 50 °C et à 60 °C. Après 1 h d'exposition à 65 °C, les deux protéases ne conservent plus qu'environ 10 % de leur activité initiale.

A partir de ces résultats expérimentaux, il est possible d'évaluer l'énergie d'activation de dénaturation des enzymes. La plupart des études réalisées sur la dénaturation des protéines par la température montrent que cette vitesse de dégradation obéit à une loi du premier ordre par rapport à la concentration d'enzyme active et suit la loi d'Arrhenius.

La Pronase SG suit effectivement une dénaturation du premier ordre puisqu'une relation linéaire est obtenue lors de la représentation graphique logarithmique de l'activité résiduelle en fonction du temps d'incubation (figure III.5.b). Ces résultats montrent également que la Pronase SG est pure. Toutefois, pour l'Alcalase 2,4L, si un bon accord est trouvé pour les faibles températures, une forte déviation apparaît dès 55 °C. La représentation logarithmique

semble se présenter sous forme de deux sections de droites de pentes différentes. Deux hypothèses (combinées ou non) peuvent être formulées pour tenter d'expliquer ce résultat : soit l'Alcalase 2,4L suit une vitesse de dénaturation qui n'est pas du premier ordre, soit elle est composée de plusieurs isoenzymes présentant chacune une stabilité différente à la température.

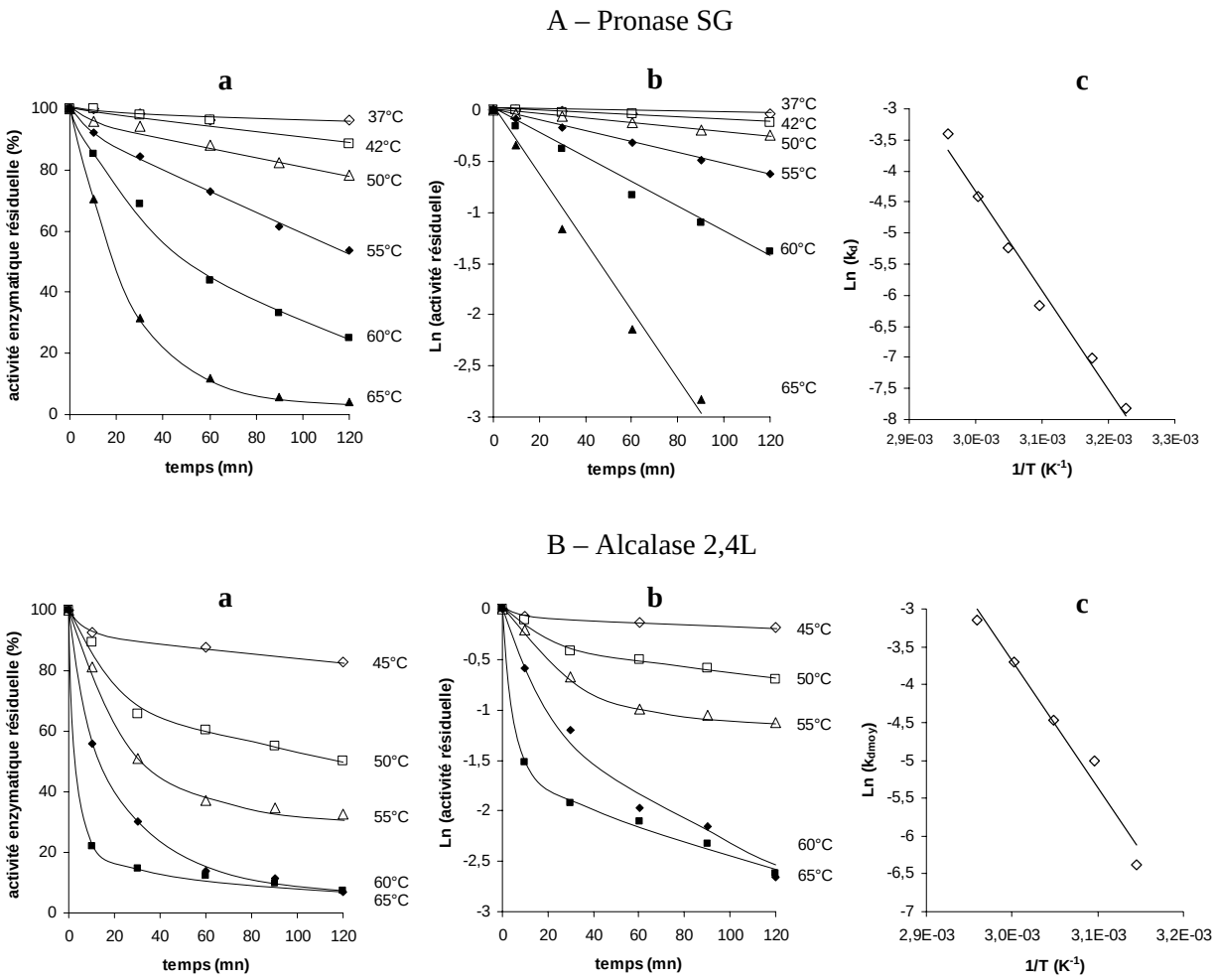


Figure III.5 : dénaturation thermique de (A) la Pronase SG et (B) l'Alcalase 2,4L. (a) Evolution de l'activité résiduelle des protéases en fonction du temps d'exposition à diverses températures. (b) Représentation logarithmique de l'évolution de l'activité résiduelle des protéases en fonction de la durée d'incubation à diverses températures. (c) Détermination des paramètres concernant la dénaturation thermique des protéases.

Afin de déterminer si l'Alcalase 2,4L suit une dénaturation du second ordre, nous avons tracé l'inverse de l'activité résiduelle en fonction de la durée d'incubation. Cependant, aucune droite distincte (mis à part à 45 °C) n'est observable avec cette représentation (non montré). Ainsi, l'hypothèse, selon laquelle l'Alcalase 2,4L serait une préparation composée de plusieurs isoenzymes de la subtilisine Carlsberg ou composée de plusieurs enzymes de sensibilité différente à la température, serait la plus probable. Finalement, dans le but

d'approximer les valeurs des constantes de dénaturation de l'Alcalase 2,4L, k_{dmoy}, nous avons tracé les droites « moyennant » tous les points de la représentation logarithmique de l'activité résiduelle en fonction du temps.

L'énergie d'activation de dénaturation des enzymes, Ed, a été déterminée en traçant le logarithmique népérien des k_d ou k_{dmoy} en fonction de l'inverse de la température (figure III.5.c). Les points apparaissent correctement alignés et la pente de la droite permet de calculer Ed puisque : $Ln(k_d) = Ln(k_{do}) - (Ed/RT)$.
Les valeurs suivantes ont été trouvées :

- pour la Pronase SG : Ed = 130×10^3 J/mol, et $k_{do} = 1,05 \times 10^{19}$ mn^{-1}.
- pour l'Alcalase 2,4L : Ed ≈ 140×10^3 J/mol, et $k_{do} \approx 18,0 \times 10^{19}$ mn^{-1}.

Ces valeurs respectent les gammes de valeurs fournies par la littérature, variant de $25,3 \times 10^3$ J/mol (hydrolyse de l'hémoglobine) à 270×10^3 J/mol (hydrolyse d'un isolat de protéines de soja) selon les conditions de mise en œuvre de l'Alcalase (Márquez et Vázquez, 1999).

III.2.1.3. Influence du pH.

** Calibration de la méthode du pH-Stat avec la méthode au TNBS.*

D'après les travaux de Van der Plancken *et al.* (2003), les valeurs de DH déterminées par la méthode du pH-Stat sont fonction du pH ; ainsi, les cinétiques d'hydrolyse, obtenues à différents pH et suivies par la méthodes du pH-Stat, ne peuvent pas être comparées les unes par rapport aux autres sans un réajustement préalable des valeurs de DH. C'est pourquoi, pour différents pH (6,5, 7,7, 8 et 9), nous avons calibré la méthode du pH-Stat avec une autre méthode du suivi de l'hydrolyse qui est indépendante du pH, la méthode au TNBS.
Les droites de corrélation entre les valeurs de DH déterminées par la méthode du pH-Stat, noté DH, et les valeurs de DH déterminées par la méthode au TNBS, noté DH_{TNBS}, sont représentées dans la figure III.6. Les corrélations suivantes ont été établies :

- pour le système Alcalase 2,4L / Globuline :
  - à pH 6,5 : $DH_{TNBS} = 0,46 \times DH$;
  - à pH 8 : $DH_{TNBS} = 0,78 \times DH$;
  - à pH 9 : $DH_{TNBS} = 0,62 \times DH$;

- pour le système Pronase SG / Globuline :
  - à pH 6,5 : $DH_{TNBS} = 0,57 \times DH$;
  - à pH 7,7 : $DH_{TNBS} = 1,24 \times DH$;
  - à pH 9 : $DH_{TNBS} = 0,87 \times DH$.

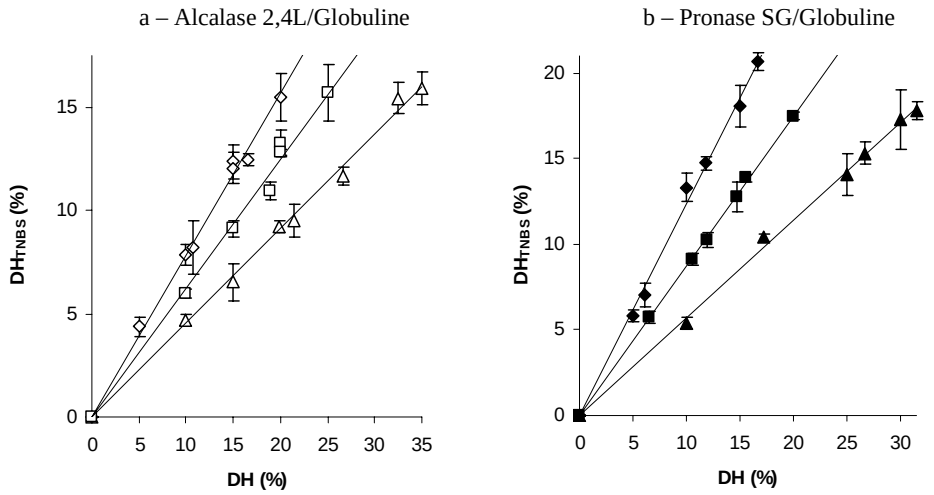


Figure III.6 : corrélations, à différents pH, entre les valeurs de DH déterminées par la méthode du pH-Stat, DH, et celles déterminées par la méthode au TNBS, DH_{TNBS}. (a) système Alcalase 2,4L / Globuline (50 °C) : (◊) pH 8, (□) pH 9, (Δ) pH 6,5 ; (b) système Pronase SG / Globuline (37 °C) : (♦) pH 7,7, (■) pH 9, (▲) pH 6,5.

Comme cela a été montré dans différentes études, le pH influence significativement la calibration de la méthode du pH-Stat mais il existe une bonne corrélation entre les valeurs de DH obtenues avec la méthode du pH-Stat et celles obtenues avec la méthode au DH_{TNBS}. Cependant, à même valeur de pH, les corrélations sont différentes entre les deux protéases. Cette différence peut s'expliquer par le type de peptides libérés au cours de l'hydrolyse. En effet, la longueur de chaîne des polypeptides influence sensiblement la valeur de pK des groupes α-aminés. La valeur de pK est en moyenne de 7,5 – 7,8 pour les polypeptides à 25 °C alors qu'elle est de 8,0 – 8,2 pour les di- et tripeptides (Adler-Nissen, 1986). Or il s'avère que la Pronase SG génère une proportion plus élevée de di- et tripeptides comparativement à l'Alcalase 2,4L. Ceci entraîne une sous-estimation de la valeur 1/α utilisée pour le calcul du DH, et, en conséquence, une sous-estimation de ce dernier.

Enfin, nous avons pu vérifier que le type de protéines, globulines ou albumines, n'influence pas la calibration de la méthode du pH-Stat (non montré).

** Influence du pH sur les cinétiques d'hydrolyse.*

L'isolat de globuline est hydrolysé par les deux protéases à trois valeurs de pH différentes mais pour des ratios Eo/So et T constants. Ces expériences sont également conduites pour différents ratios Eo/So. Le pH n'influence pas l'allure générale des courbes d'hydrolyse (non montré) mais affecte significativement l'étendue de la dégradation protéique. Pour illustrer ce

dernier point, les valeurs de DH_{TNBS}, obtenues après 13,8 h de réaction avec l'Alcalase 2,4L et après 7 h d'hydrolyse avec la Pronase SG, ont été relevées dans les tableaux III.2 et III.3. Il apparaît effectivement qu'à un ratio Eo/So donné, l'Alcalase 2,4L dégrade davantage les protéines à pH 8 qu'à pH 9 ou à pH 6,5 et l'hydrolyse des globulines par la Pronase SG est plus importante à pH 6,5 et à pH 7,7 qu'à pH 9.

Tableau III.2 : DH_{TNBS} (en %) obtenus après 13,8 h de réaction pour des hydrolyses de l'isolat de globulines avec l'Alcalase 2,4L conduites à différents pH et pour différents ratios Eo/So (T = 50 °C).

	Alcalase 2,4L		
pH / **ratio Eo/So (%)**	**6,5**	**8**	**9**
0,7	9,1	13,0	11,8
2	12,1	16,1	12,6
4,3	14,8	19,2	15,6
10	17,6	20,5	16,6

Tableau III.3 : DH_{TNBS} (en %) obtenus après 7 h de réaction pour des hydrolyses de l'isolat de globulines avec la Pronase SG conduites à différents pH et pour différents ratios Eo/So (T = 37 °C).

	Pronase SG		
pH / **ratio Eo/So (%)**	**6,5**	**7,7**	**9**
0,1	9,8	9,6	5,7
0,2	15,2	14,6	9,6
0,6	17,1	19,9	13,6
3	25,0	25,7	22,1

** Influence du pH sur les constantes cinétiques.*

Il est bien connu que le pH modifie, d'une part, la solubilité et la distribution de charge du substrat protéique et, d'autre part, l'état d'ionisation du site actif de l'enzyme, induisant une modification de la catalyse enzymatique. Afin de mieux caractériser ces phénomènes, nous avons déterminé les constantes cinétiques apparentes, Km_{TNBS}, k_{2TNBS} et k_{2TNBS}/Km_{TNBS} (calculées à partir du DH_{TNBS}), aux trois pH de l'étude (tableaux III.4 et III.5).

Tableau III.4 : influence du pH sur les valeurs estimées de la constante de vitesse apparente, k_{2TNBS}, de la constante de Michaelis apparente, Km_{TNBS}, et de la spécificité de substrat, k_{2TNBS}/Km_{TNBS}, pour le système Alcalase 2,4L/Globuline.

	Alcalase 2,4L / Globuline		
pH	**Km_{TNBS} (g/L)**	**k_{2TNBS} (h^{-1})**	**k_{2TNBS}/Km_{TNBS} (L/g.h)**
6,5	2,2	12,2	5,6
8	9,1	17,1	1,9
9	14,9	17,7	1,2

Tableau III.5 : influence du pH sur les valeurs estimées de la constante de vitesse apparente, k_{2TNBS}, de la constante de Michaelis apparente, Km_{TNBS}, et de la spécificité de substrat, k_{2TNBS}/Km_{TNBS}, pour le système Pronase SG/Globuline.

	Protéase P6911 / Globuline		
pH	**Km_{TNBS} (g/L)**	**k_{2TNBS} (h^{-1})**	**k_{2TNBS}/Km_{TNBS} (L/g.h)**
6,5	11,6	155,0	13,4
7,7	12,3	157,1	12,8
9	15,8	87,2	5,5

Les résultats du tableau III.4 montrent que l'efficacité catalytique de l'Alcalase est plus importante à pH 6,5 (k_{2TNBS}/Km_{TNBS} = 5,6 L/g.h) qu'à pH 8 ou pH 9 (k_{2TNBS}/Km_{TNBS} = 1,2 – 1,9 L/g.h). Ceci s'explique par le fait que l'enzyme a une affinité apparente envers les globulines plus importante à pH 6,5 qu'à pH 8 alors que sa vitesse de catalyse varie peu d'un pH à l'autre. Ainsi, au départ de la réaction, l'Alcalase 2,4L serait plus efficace à pH 6,5 qu'à pH 8 mais, avec l'avancement de la réaction, celle-ci s'inactiverait plus rapidement, ou serait plus fortement inhibée, ou encore, serait moins réactive à l'encontre du substrat à pH 6,5 qu'à pH 8.

La Pronase SG possède quasiment la même efficacité catalytique à pH 6,5 et à pH 7,7 avec une valeur de 13 L/g.h. Comparativement à ces deux pH, elle devient moins efficace à pH 9 (k_{2TNBS}/Km_{TNBS} = 5,5 L/g.h) due à une diminution de moitié de sa vitesse de catalyse et d'une légère perte d'affinité envers le substrat.

Enfin, en comparant les résultats des tableaux III.4 et III.5, il apparaît qu'à un pH donné, la Pronase SG hydrolyse plus efficacement les globulines que l'Alcalase 2,4L, notamment grâce à sa vitesse de catalyse environ 10 fois plus rapide.

III.2.2. Influence des conditions opératoires sur la nature des peptides générés.

III.2.2.1. Influence de So, de Eo et de T.

** Influence de So, de Eo et de T sur la répartition de taille des peptides.*

Afin de caractériser l'influence de So, de Eo et de T sur la taille moléculaire des peptides produits au cours de l'hydrolyse, des hydrolysats de DH similaires (DH de 5, 10, 15 et 20 %), mais générés pour différentes conditions opératoires (excepté le pH), ont été analysés par CLHP-ET. Les figures III.7.A et III.7.B présentent, pour les différents systèmes enzyme/substrat, l'évolution de la répartition de taille des peptides des différents hydrolysats en fonction du DH.

Pour les trois systèmes enzyme/substrat, la répartition de taille moléculaire des peptides apparaît corrélée au DH indépendamment de So et de Eo (figure III.7.A). Ainsi, elle est également indépendante du temps. De même, pour les systèmes Alcalase 2,4L/Globuline et Pronase SG/Albumine, la répartition de taille des peptides est fonction du DH mais elle est indépendante de T (figure III.7.B).

Ainsi, So, Eo et T ne sont pas des paramètres influençant la répartition de taille des peptides à un DH donné. De ce fait, ils ne semblent pas représenter des paramètres significatifs contrôlant les produits d'hydrolyse. A un pH donné, le DH semble être un paramètre suffisant

pour permettre le contrôle et la prédiction de la répartition de taille des peptides dans les conditions de classification des peptides retenues.

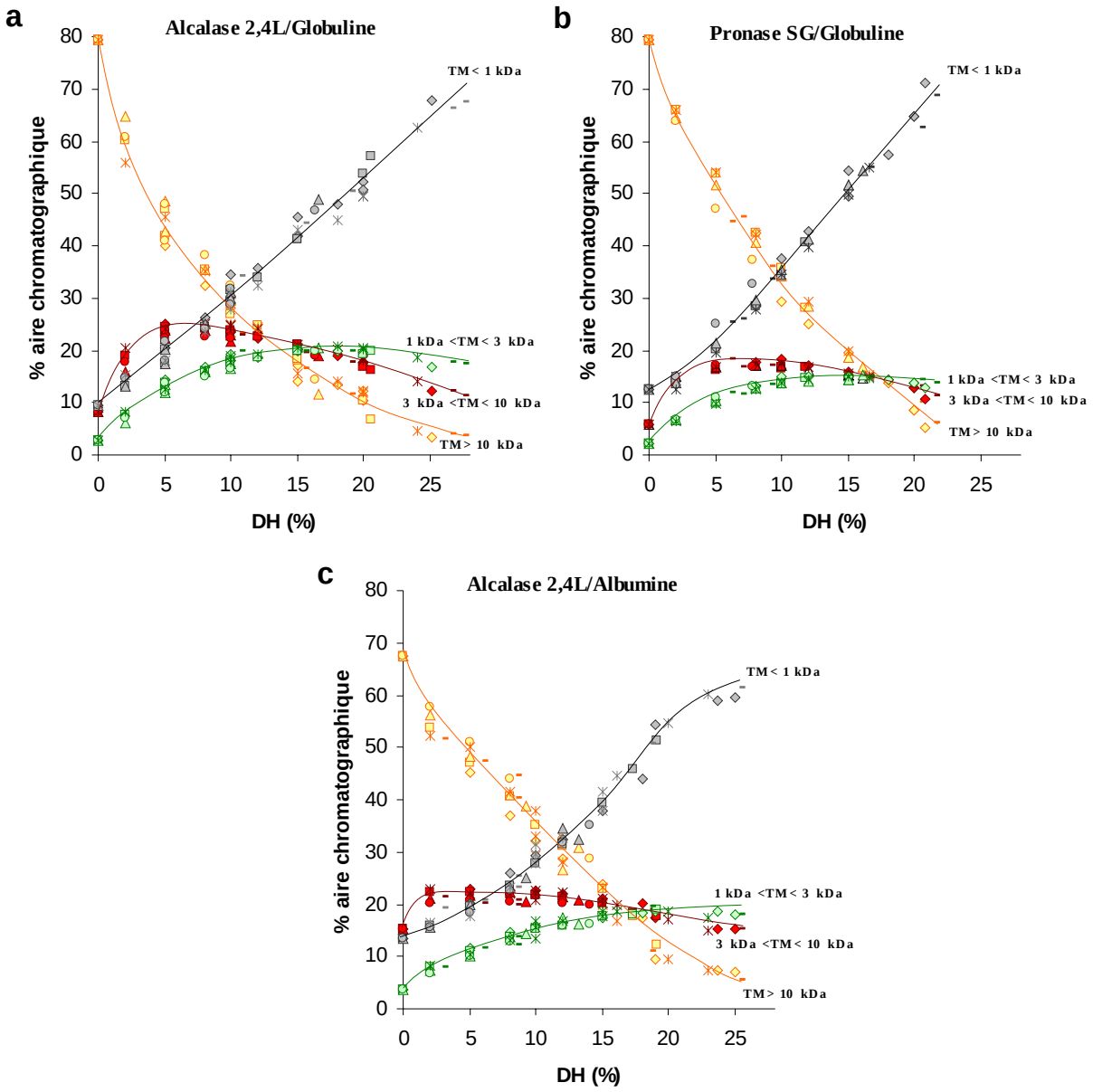


Figure III.7.A : influence de la concentration initiale en substrat, So, et de la concentration initiale en enzyme, Eo, sur la répartition de taille des peptides des hydrolysats obtenus avec les systèmes : (a) Alcalase 2,4L/Globuline, (b) Pronase SG/Globuline et (c) Alcalase 2,4L/Albumine.
Conditions réactionnelles pour les systèmes enzyme/substrat avec l'Alcalase 2,4L : pH = 8, T = 50 °C et (◊) So = 40 g/L et Eo = 4 mL/L, (□) So = 40 g/L et Eo = 0,8 mL/L, (Δ) So = 40 g/L et Eo = 0,28 mL/L, (○) So = 81 g/L et Eo = 0,8 mL/L, (*) So = 18,8 g/L et Eo = 0,8 mL/L. (-) hydrolysats finaux de l'étude cinétiques obtenus pour d'autres valeurs de Eo et de So.
Conditions réactionnelles pour le système Pronase SG/Globuline : pH = 7,7, T = 37 °C et (◊) So = 40 g/L et Eo = 1,2 g/L, (□) So = 40 g/L et Eo = 0,084 g/L, (Δ) So = 40 g/L et Eo = 0,24 g/L, (○) So = 81 g/L et Eo = 0,084 g/L, (*) So = 18,8 g/L et Eo = 0,084 g/L. (-) hydrolysats finaux de l'étude cinétiques obtenus pour d'autres valeurs de Eo et de So.
Domaines de taille moléculaire : (**orange**) supérieur à 10 kDa, (**rouge**) compris entre 3 et 10 kDa, (**vert**) compris entre 1 et 3 kDa et (**gris**) inférieur à 1 kDa. Système chromatographique CLHP-ET : colonne Superdex Peptide H/R 10/30, détection : 214 nm, solvant : eau/ACN/TFA (60/40/0,1), débit : 0,6 mL/mn.

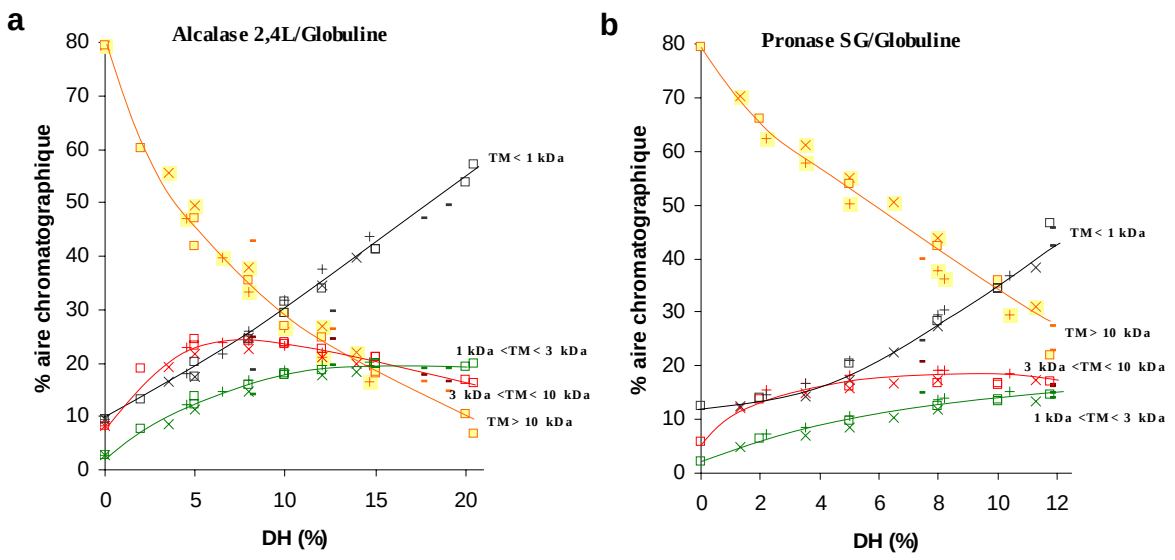


Figure III.7.B : influence de la température, T, sur la répartition de taille des peptides des hydrolysats obtenus avec les systèmes : (a) Alcalase 2,4L/Globuline et (b) Pronase SG/Globuline. Conditions réactionnelles pour le système avec l'Alcalase 2,4L : pH = 8, So = 40 g/L, Eo = 0,8 mL/L et (□) T = 50 °C, (×) T = 37 °C, (+) T = 60 °C. Conditions réactionnelles pour le système avec la Pronase SG : pH = 7,7, So = 40 g/L, Eo = 0,084 g/L et (□) T = 37 °C, (×) T = 28 °C, (+) T = 50 °C. (-) hydrolysats finaux de l'étude cinétiques obtenus pour d'autres valeurs de T. Domaines de taille moléculaire : (**orange**) supérieur à 10 kDa, (**rouge**) compris entre 3 et 10 kDa, (**vert**) compris entre 1 et 3 kDa et (**gris**) inférieur à 1 kDa.

L'évolution de la répartition de taille des peptides en fonction du DH diffère peu suivant la nature du substrat protéique ou suivant le type de protéase employé. Cette évolution en fonction du DH est caractérisée par :

- une diminution progressive des protéines et des polypeptides de tailles moléculaires supérieures à 10 kDa,
- une augmentation progressive des petits peptides (< 1 kDa),
- une augmentation de la proportion de peptides de tailles intermédiaires jusqu'à un DH de 3 – 7 % pour les peptides de taille moléculaire 3 – 10 kDa et jusqu'à un DH de 15 – 17 % pour les peptides de taille moléculaire 1 – 3 kDa, suivie d'une diminution lente de leurs proportions.

Ainsi, pour ces systèmes, l'hydrolyse semble s'effectuer simultanément sur l'ensemble des protéines entraînant la génération de longs peptides intermédiaires qui sont ensuite dégradés en peptides plus petits. L'hydrolyse suit donc un mécanisme de type zipper.

Les profils des chromatogrammes d'exclusion de taille des hydrolysats à un DH donné (figure III.8) sont différents d'un système enzyme/substrat à l'autre, indiquant une différence de nature des peptides. Ainsi, même si l'évolution de la répartition de taille des peptides en fonction du DH est assez similaire d'un système enzyme/substrat à l'autre, à un DH donné, la

composition peptidique des hydrolysats est différente selon le système enzyme/substrat considéré.

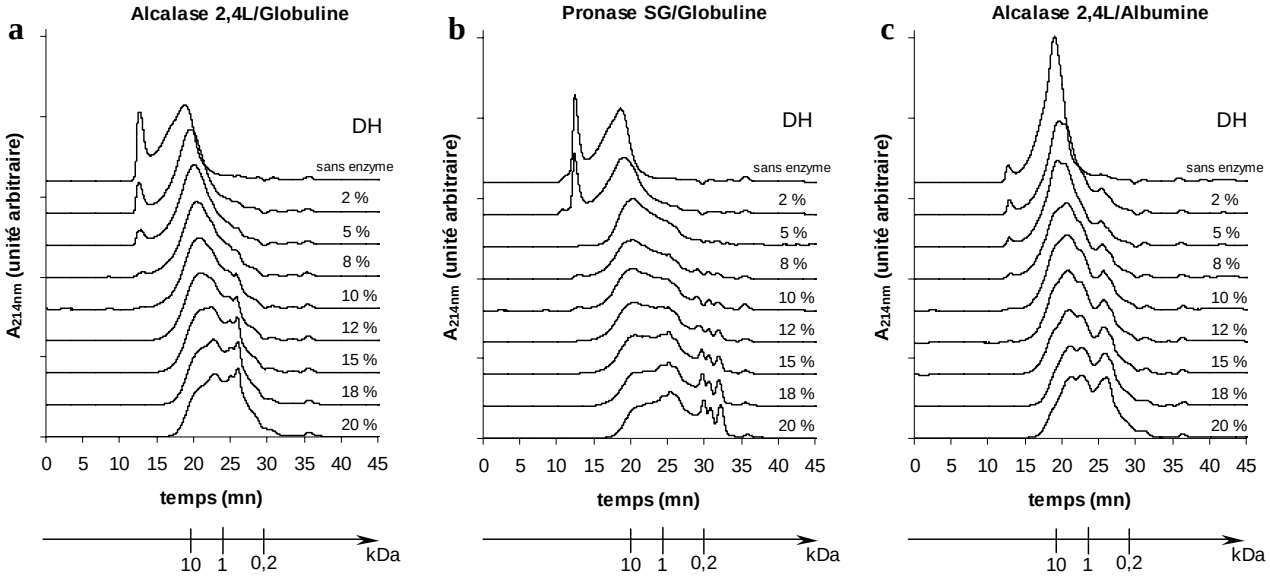


Figure III.8 : profils des chromatogrammes CLHP-ET d'hydrolysats de DH différents. Systèmes enzyme/substrat : (a) Alcalase 2,4L/Globuline (pH = 8, T = 50 °C, So = 18,8 g/L, Eo = 0,8 mL/L), (b) Pronase SG/Globuline (pH = 7,7, T = 37 °C, So = 40 g/L, Eo = 1,2 g/L), (c) Alcalase 2,4L/Albumine (pH = 8, T = 50 °C, So = 40 g/L, Eo = 4 mL/L).

La CLHP-ET permet de séparer les molécules suivant leur taille moléculaire mais elle ne fournit aucune indication quant au caractère hydrophile/hydrophobe des peptides produits lors de l'hydrolyse. C'est pourquoi, les hydrolysats ont été analysés par CLHP-PI, technique chromatographique qui permet de séparer les molécules suivant leur propriété d'hydrophobie et plus résolutive que la CLHP-ET.

** Influence de Eo, de So et de T sur le caractère hydrophobe des peptides.*

A un DH donné, les profils chromatographiques obtenus par CLHP-PI (figure III.9.A) sont différents d'un système enzyme/substrat à l'autre, confirmant la génération de peptides de nature différente. Pour chaque système enzyme/substrat, le profil chromatographique évolue en fonction du DH : en général, plus le DH est élevé, plus les peptides de nature très hydrophobe (IH > 26 ; tr > 37 mn) disparaissent au profit de peptides de nature moins hydrophobe (10,5 < IH < 26 ; 27,5 mn < tr < 37 mn), amphiphile (5 < IH < 10,5 ; 6 < tr < 27,5 mn) ou hydrophile (IH < 5 ; tr < 6 mn).

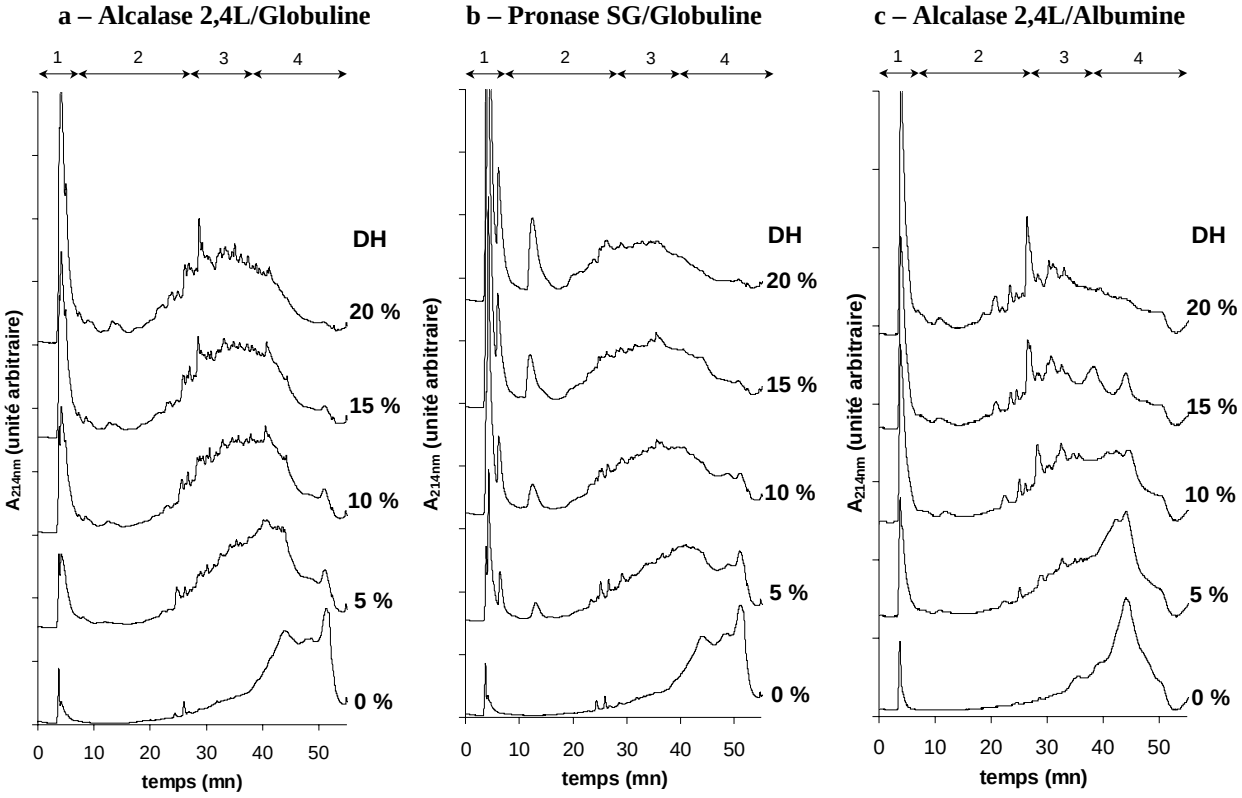


Figure III.9.A : profils des chromatogrammes CLHP-PI d'hydrolysats de DH différents. Systèmes enzyme/substrat : (a) Alcalase 2,4L/Globuline (pH = 8, T = 50 °C, So = 40 g/L, Eo = 0,8 mL/L), (b) Pronase SG/Globuline (pH = 7,7, T = 37 °C, So = 18,8 g/L, Eo = 0,084 g/L), (c) Alcalase 2,4L/Albumine (pH = 8, T = 50 °C, So = 40 g/L, Eo = 4 mL/L).
Fractions d'indice d'hydrophobie (IH) des peptides : (1) IH < 5 ou peptides hydrophiles, (2) 5 < IH < 10,5 ou peptides amphiphiles, (3) 10,5 < IH < 26 ou peptides hydrophobes, (4) IH > 26 ou peptides très hydrophobes.
Système chromatographique : colonne C_{18} Prosphere 300Å, détection : 214 nm, solvant : gradient linéaire de mélanges eau/ACN/TFA, débit : de 0 à 43 mn, 0,2 mL/mn et de 43 à 63 mn, 0,3 mL/mn.

Lorsque les figures III.8 et III.9.A sont comparées, l'évolution de la répartition de taille moléculaire des peptides en fonction du DH semble être liée à celle de la répartition du caractère hydrophobe. En effet, plus le DH augmente, plus la proportion en petits peptides augmente au détriment des protéines et polypeptides de taille moléculaire intermédiaire et plus le mélange peptidique est composé de peptides hydrophiles ou amphiphiles au détriment des peptides plus ou moins hydrophobes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Van der Ven *et al.* (2001) qui ont montré une corrélation entre les profils d'élution d'hydrolysats obtenus par CLHP-ET et ceux obtenus par CLHP-PI.

Les hydrolysats de DH similaires mais obtenus en utilisant des conditions de Eo et So différentes sont analysés par CLHP-PI. La figure III.9.B présente ceux du système Alcalase 2,4L/Globuline.

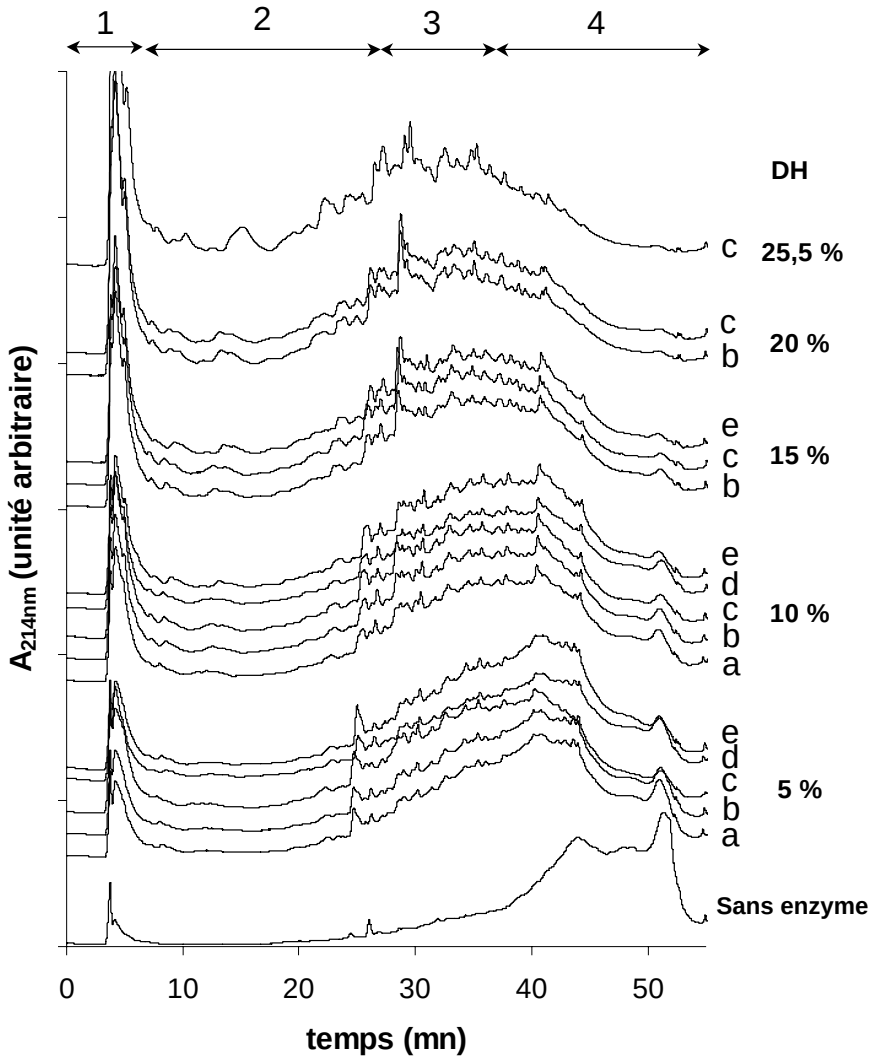


Figure III.9.B : influence de So et de Eo sur le profil chromatographique CLHP-PI des hydrolysats obtenus avec le système Alcalase 2,4L/Globuline, et caractérisés par des DH similaires : 5, 10, 15 ou 20 %.
Conditions réactionnelles : pH 8, T = 50 °C et (a) So = 40 g/L, Eo = 0,28 mL/L, (b) So = 40 g/L, Eo = 0,8 mL/L, (c) So = 40 g/L, Eo = 4 mL/L, (d) So = 81 g/L, Eo = 0,8 mL/L, (e) So = 18,8 g/L, Eo = 0,8 mL/L.
Fractions d'indice d'hydrophobie (IH) des peptides : (1) IH < 5 ou peptides hydrophiles, (2) 5 < IH < 10,5 ou peptides amphiphiles, (3) 10,5 < IH < 26 ou peptides hydrophobes, (4) IH > 26 ou peptides très hydrophobes.

Pour chacun des systèmes enzyme/substrat, à un DH donné, les profils chromatographiques CLHP-PI des hydrolysats semblent indépendants des valeurs de Eo et de So choisies pour l'hydrolyse. Toutefois, il est observé qu'aux DH faibles (< 10 %), les profils chromatographiques des hydrolysats obtenus avec des Eo élevés sont assez différents de ceux obtenus pour les autres conditions opératoires. Ceci serait dû à l'impossibilité d'arrêter de manière instantanée la réaction enzymatique qui est très rapide dans ces conditions.

Ces résultats suggèrent qu'à un DH donné, les peptides produits sont similaires quelles que soient les valeurs de So ou de Eo.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, la masse de tous les peptides < 1000 Da séparés par CLHP-PI a été déterminée par spectrométrie de masse.

** Influence de Eo, de So et de T sur la composition en peptides < 1000 Da.*

Chaque peptide inférieur à 1000 Da est caractérisé par sa masse exacte ($M+H^+$) et son temps de rétention (tr) sur la colonne en phase inverse. Pour chaque hydrolysat, une carte peptidique est alors établie. Les cartes peptidiques des hydrolysats de DH similaires mais générés à différents So et Eo sont comparées. Deux peptides sont considérés comme identiques s'ils possèdent à la fois le même temps de rétention à plus ou moins 0,5 mn et la même masse $M+H^+$ à plus ou moins 0,6 unité de masse. Le tableau III.6 présente, à titre d'exemple avec le système Alcalase 2,4L/Globuline, le pourcentage de peptides similaires entre des hydrolysats de même DH.

Tableau III.6 : pourcentage de peptides (< 1 kDa) similaires entre des hydrolysats de même DH mais générés à différentes concentrations initiales en isolat de globulines et à différentes concentration initiale en Alcalase 2,4L. Les peptides ont été séparés par CLHP-PI et identifiés par spectrométrie de masse.

DH (%)	So-Eo (g/L-mL/L)	% de similarité					Nombre total de peptides < 1 kDa
		40-0,28	**40-0,8**	**40-4**	**81-0,8**	**18,8-0,8**	
5	**40-0,28**	100	64,7	62,5	70,0	76,5	28
	40-0,8	×	100	62,5	71,0	87,9	29
	40-4	×	×	100	57,9	70,7	37
	81-0,8	×	×	×	100	67,6	24
	18,8-0,8	×	×	×	×	100	33
10	**40-0,28**	100	90,2	86,3	86,0	88,0	49
	40-0,8	×	100	84,9	80,0	89,8	48
	40-4	×	×	100	84,6	82,0	50
	81-0,8	×	×	×	100	82,4	46
	18,8-0,8	×	×	×	×	100	47
15	**40-0,8**	×	100	92,1	×	85,7	71
	40-4	×	×	100	×	83,5	75
	18,8-0,8	×	×	×	×	100	70
20	**40-0,8**	×	100	92,0	×	×	101
	40-4	×	×	100	×	×	93
25,5	**40-4**	×	×	×	×	×	135

Dans tous les cas étudiés, les cartes peptidiques sont similaires à plus de 58 % (69 % en moyenne) à DH 5%, et à plus de 80 % pour les DH 10, 15 et 20 % (en moyenne respectivement : 85, 87 et 92 %). Pour les autres systèmes enzyme/substrat, les pourcentages

de similarité varient entre 62 et 87 %. Ces résultats confirment les résultats précédents à savoir que Eo et So n'influencent pas significativement, à un DH donné, la composition en peptides du mélange réactionnel.

Comme le montre le tableau III.6, le nombre total de peptides identifiés par la spectrométrie de masse augmente lorsque le DH augmente, allant d'environ 30 à DH 5 % à environ 100 – 135 à DH 20 – 25 %. De plus, il apparaît que la majorité des peptides < 1000 Da produits à DH 5 % seraient également présents à DH 10 %, et que les peptides identifiés à DH 10 % seraient quasiment tous retrouvés à DH 15 %, et ainsi de suite. Cette apparition « ordonnée » des peptides au cours de l'hydrolyse montrerait que les liaisons peptidiques sont clivées dans un ordre relativement précis. Cette hypothèse serait alors en accord avec les travaux de O'Meara et Munro (1984) qui ont suggéré que la diminution de la vitesse d'hydrolyse est le résultat, dans une première phase, d'un clivage rapide des liaisons peptidiques « sensibles » à l'hydrolyse et, dans une seconde phase, d'un clivage plus lent des liaisons peptidiques moins « sensibles ». Ces résultats sont également en accord avec les travaux d'Adler-Nissen (1978) qui ont montré que la diminution de la vitesse d'hydrolyse est attribuée à une diminution graduelle des liaisons peptidiques les plus réactives.

Ainsi, nous avons montré que la nature et la composition des peptides produits au cours de l'hydrolyse est corrélée au DH et est indépendante de Eo, de So, de T et du temps. Un tel résultat avait déjà été suggéré par Adler-Nissen (1982) et, en partie, montré par González-Tello *et al.* (1994b).

III.2.2.2. Influence du pH sur les systèmes enzyme/Globulines.

D'après les travaux de Adler-Nissen (1986) et de Márquez et Fernández (1998), le pH est un paramètre significatif pour la production d'hydrolysats par voie enzymatique. Toutefois, à notre connaissance, peu de travaux portent sur la caractérisation fine de l'influence du pH sur les produits d'hydrolyse.

Les hydrolysats des systèmes enzyme/Globuline, générés à différents pH, ont été analysés par CLHP-ET et par CLHP-PI couplée à la spectrométrie de masse.

L'évolution de la répartition de taille des mélanges peptidiques en fonction du DH_{TNBS} (figure III.10) montre que le pH influence peu la répartition de taille des mélanges peptidiques à un DH_{TNBS} donné (excepté pour le système Pronase SG/Globuline où l'évolution de la répartition

de taille à pH 6,5 est significativement différente de celles obtenues aux deux autres pH). Toutefois, aux erreurs expérimentales près et à cause de la faible capacité résolutive de la CLHP-ET, ces expériences ne permettent pas d'affirmer que le pH influence la composition peptidique des hydrolysats de DH_{TNBS} similaires. Afin de déterminer si le pH est ou non un paramètre significatif de l'hydrolyse, plusieurs hydrolysats ont également été analysés par CLHP-PI couplée à la spectrométrie de masse.

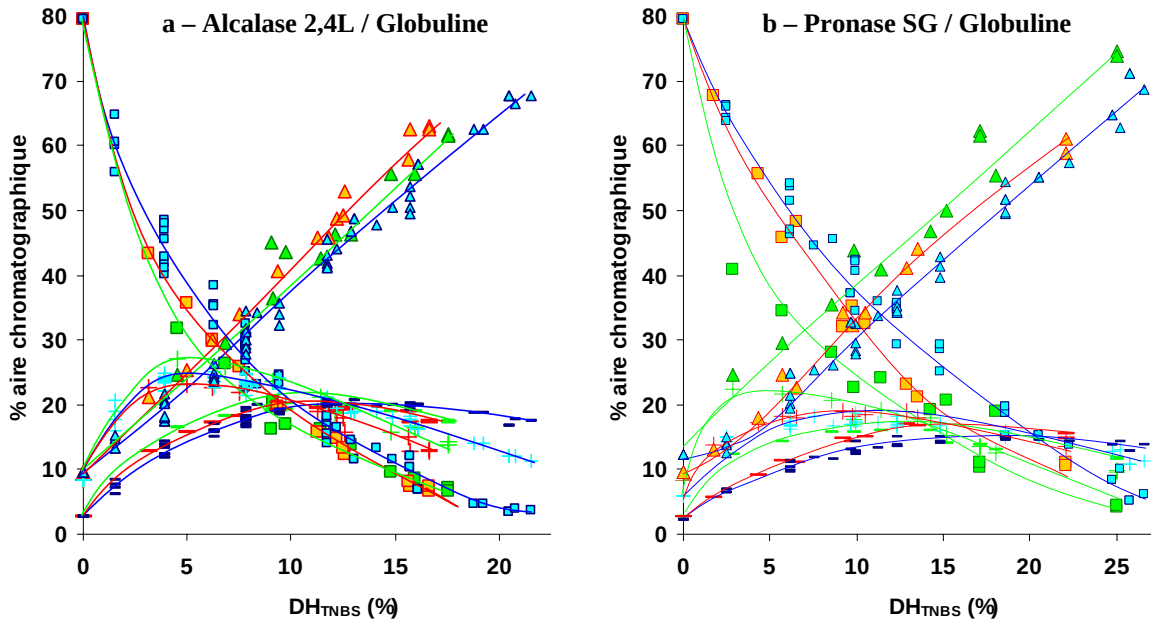


Figure III.10 : influence du pH sur la répartition de taille des peptides produits lors de l'hydrolyse de l'isolat de globuline par (a) l'Alcalase 2,4L et (b) la Pronase SG.
Conditions réactionnelles avec l'Alcalase 2,4L : (**vert**) pH 6,5, (**bleu**) pH 8, (**rouge**) pH 9.
Conditions réactionnelles avec la Pronase SG : (**vert**) pH 6,5, (**bleu**) pH 7,7, (**rouge**) pH 9.
Domaines de taille moléculaire : (□) supérieur à 10 kDa, (+) compris entre 3 et 10 kDa, (–) compris entre 1 et 3 kDa, (Δ) inférieur à 1 kDa.

Nous avons alors procédé de la manière suivante.

- Les cartes peptidiques de tous les hydrolysats préalablement produits (de DH 5, 10, 15, 20 % et supérieur à 20 %) et obtenues à pH 8 pour l'Alcalase 2,4L (tableau III.6) ou à pH 7,7 pour la Pronase SG ont été rassemblées afin de constituer, pour chaque enzyme, une unique carte peptidique « de référence » contenant tous les peptides inférieurs à 1000 Da susceptibles d'être générés au cours de l'hydrolyse à pH 8 ou à pH 7,7 selon l'enzyme.
- Chaque carte peptidique des hydrolysats obtenus à pH 6,5 ou à pH 9 est comparée, selon l'enzyme, aux cartes « de référence » respectives. Deux peptides sont supposés identiques s'ils possèdent à la fois le même temps de rétention (± 0,5 mn) et la même masse $M+H^+$ (±

0,6 unité de masse). Le pourcentage de recouvrement, entre une carte peptidique d'un hydrolysat obtenu à pH 6,5 ou à pH 9 et la carte peptidique « de référence », est défini comme suit :

$$\text{\% de recouvrement} = \frac{\text{Nombre de peptides dans l'hydrolysat généré à pH 6,5 ou à pH 9 présents dans la carte peptidique « de référence »}}{\text{Nombre total de peptides de l'hydrolysat généré à pH 6,5 ou à pH 9}}$$

Les résultats, rassemblés dans les tableaux III.7 et III.8, font apparaître que, pour les systèmes réactionnels étudiés, les peptides inférieurs à 1000 g/mol générés à pH 6,5 sont retrouvés à hauteur de 78 – 94 % dans les cartes peptidiques « de référence ». De même, entre 57 et 84 % des peptides inférieurs à 1000 g/mol produits à pH 9 sont également générés aux pH de référence. Il ressort également que plus le DH_{TNBS} augmente, plus le pourcentage de recouvrement diminue.

Tableau III.7 : pour le système Alcalase 2,4L/globulines, pourcentage de recouvrement entre la carte peptidique d'un hydrolysat généré à pH 6,5 ou à pH 9 et la carte peptidique « de référence » à pH 8. Le nombre total de peptides de la carte peptidique à pH 8 est 176.

Alcalase 2,4L/Globulines					
pH 6,5			**pH 9**		
DH_{TNBS} (%)	Nombre total de peptides	% de recouvrement	DH_{TNBS} (%)	Nombre total de peptides	% de recouvrement
9,7	65	94	10,0	69	84
12,1	77	93	12,4	100	79
17,6	110	83	16,6	121	77

Tableau III.8 : pour le système Pronase SG/globulines, pourcentage de recouvrement entre un hydrolysat généré à pH 6,5 ou à pH 9 et la carte peptidique « de référence » à pH 7,7. Le nombre total de peptides de la carte peptidique à pH 7,7 est 117.

Pronase SG/Globulines					
pH 6,5			**pH 9**		
DH_{TNBS} (%)	Nombre total de peptides	% de recouvrement	DH_{TNBS} (%)	Nombre total de peptides	% de recouvrement
15,2	64	92	9,2	34	82
17,1	87	87	13,6	53	75
25,0	91	78	22,1	91	57

Ainsi, bien que la majorité des peptides inférieurs à 1000 g/mol générés à pH 6,5 ou à pH 9 soient également générés à pH 8, les compositions peptidiques ne sont pas strictement identiques d'un pH à l'autre. A priori, une modification du pH semble provoquer une variation de la nature des peptides générés, même si cette variation est peu importante. Le pH serait probablement responsable d'une différence de réactivité de l'enzyme à l'encontre des

liaisons peptidiques clivables ou d'une modification de l'accessibilité des liaisons peptidiques par la protéase. Il est également probable que le pH ait une action non négligeable au niveau de la spécificité d'action de l'enzyme.

En conclusion, même si ces effets sont peu significatifs, la nature des peptides constituant un hydrolysat de DH donné semblent être dépendante du pH de l'hydrolyse.

III.2.3. Récapitulatif de l'influence des paramètres opératoires sur la cinétique d'hydrolyse et la nature des peptides produits.

Dans une première phase, nous avons montré que les paramètres opératoires (Eo, So, T et pH) influencent significativement la cinétique d'hydrolyse des trois systèmes enzyme/substrat étudiés : Alcalase 2,4L/Globuline, Pronase SG/Globuline, Alcalase 2,4L/Albumine. Les constantes cinétiques apparentes de chaque système enzyme/substrat (vitesse maximale, Vm, constante de Michaelis, Km), ainsi que les énergies d'activation de la réaction (Ea) et de dénaturation des enzymes (Ed), ont été déterminées. Chaque système enzyme/substrat est caractérisé par des constantes Vm et Km qui lui sont propres et dont les valeurs sont fortement influencées par le pH. Les deux enzymes sont caractérisées par des valeurs similaires de Ea et de Ed.

Dans une seconde phase, nous avons montré, par CLHP-ET et par CLHP-PI couplée à la spectrométrie de masse, qu'à un DH donné, les propriétés physico-chimiques des peptides constituant l'hydrolysat (taille moléculaire et caractère hydrophile-hydrophobe) sont indépendantes de So, de Eo et de T mais dépendantes, de manière restreinte, du pH. Les résultats obtenus confirment certains de ceux décrits dans la littérature. Ainsi, la production d'un mélange de peptides aux propriétés fonctionnelles ou aux activités biologiques données peut être contrôlée par seulement deux paramètres : le DH et le pH. La valeur des autres paramètres So, Eo et T peut être choisie indépendamment. Ainsi, à pH constant, la prédiction de l'évolution temporelle du DH en fonction de Eo, So et T est une méthode satisfaisante pour la production de mélanges peptidiques ciblés.

III.3. MODELISATION DES CINETIQUES D'HYDROLYSE.

L'objectif de cette partie est de construire, pour chaque système enzyme/substrat, un modèle phénoménologique capable de prédire l'évolution temporelle du DH quelle que soit la concentration initiale du substrat et de l'enzyme.

Lors des études précédentes, nous avons observé que, pour tous les systèmes enzyme/substrat, la vitesse d'hydrolyse diminue très rapidement et de manière asymptotique en fonction du temps. La première partie de ce chapitre est consacrée à la détermination des phénomènes susceptibles de provoquer cette diminution de la vitesse réactionnelle avec l'avancement de la réaction. Des hypothèses concernant le mécanisme du processus de l'hydrolyse pourront alors être formulées afin de construire un modèle phénoménologique basé sur le schéma réactionnel de Michaelis-Menten.

III.3.1. Mise en évidence des phénomènes impliqués dans la protéolyse enzymatique.

III.3.1.1. Nombre maximal de liaisons peptidiques clivables.

A cause de leur spécificité, les protéases ne sont capables d'hydrolyser qu'un certain nombre de liaisons peptidiques des protéines. Ce nombre maximal de liaisons peptidiques clivables dépend de la nature de l'enzyme et du substrat. Il correspond au DH maximal pouvant être atteint dans le système, et est appelé, par la suite, DH limite ou DH_{lim}. Lors de l'étude cinétique, une valeur expérimentale de 21,5 % a été déterminée pour le DH_{lim} du système Pronase SG/Globuline.

Pour les systèmes avec l'Alcalase 2,4L, nous avons hydrolysé les globulines ou les albumines à un ratio Eo/So très élevé (Eo/So = 20 % avec So = 1 g/L). Les valeurs de DH_{lim} sont les suivantes :

- pour le système Alcalase 2,4L/Globuline, DH_{lim} = 31,6 ± 1,3 %,
- pour le système Alcalase 2,4L/Albumine, DH_{lim} = 28,0 ± 1,0 %.

III.3.1.2. Inhibition des enzymes par excès de substrat et évolution de la nature du substrat au cours de l'hydrolyse.

Lors de l'étude précédente, nous avons montré que les protéases utilisées ne sont pas inhibées par la présence d'un excès de substrat.

Les résultats précédents ont également mis en évidence que la nature du substrat évolue de manière très sensible tout au long de la réaction. Ceci pourrait entraîner une évolution des valeurs des constantes cinétiques. Ces considérations nous ont conduit à mettre en place une série d'expériences ayant pour but de déterminer les paramètres cinétiques au cours de l'hydrolyse (notés Vm* et Km*). Pour cela, Vm* et Km* ont été déterminés, non pas à partir du substrat originel, mais à partir du substrat pré-hydrolysé. Cette expérience est conduite sur plusieurs substrats pré-hydrolysés de DH différents afin de tracer Vm* et Km* en fonction du DH (figure III.11).

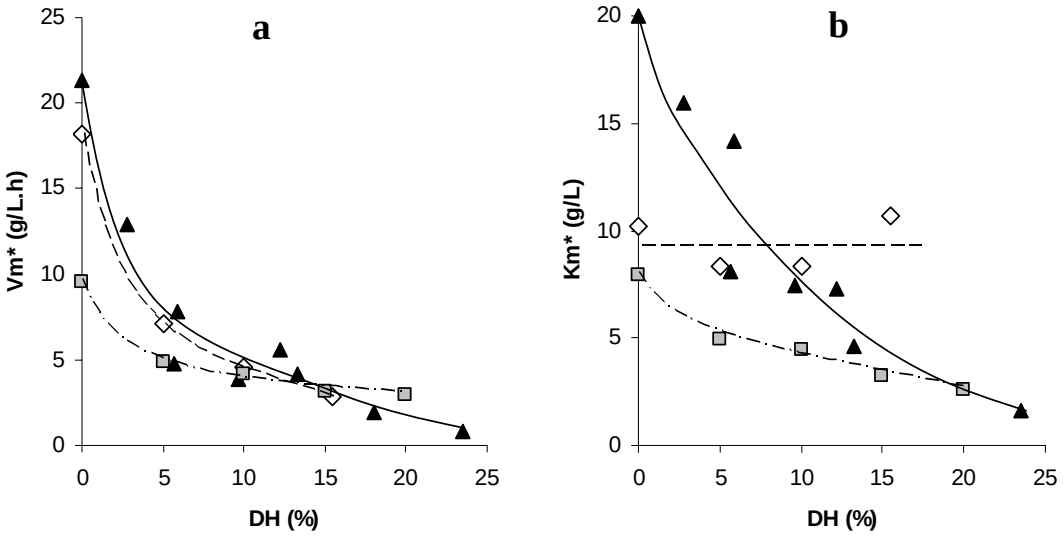


Figure III.11 : (a) évolution de Vm* en fonction du DH et (b) évolution de Km* en fonction du DH, pour différents systèmes enzymes/substrat : (---◊---) Alcalase 2,4L/Globuline (pH 8, 50 °C), (—·—□—·—) Pronase SG/Globuline (pH 7,7, 37 °C) et (—▲—) Alcalase 2,4L/Albumine (pH 8, 50 °C).

Pour les trois systèmes enzyme/substrat, l'évolution de Vm* en fonction du DH a une allure hyperbolique (figure III.11.a). Adler-Nissen (1978) avait également observé une diminution de Vm au cours de l'hydrolyse. Ces résultats montrent une différence de réactivité des liaisons peptidiques clivables. Ainsi, les liaisons peptidiques seraient clivées dans un ordre précis, des plus réactives aux moins réactives. Cette diminution de Vm* en fonction du DH contribue à la diminution de la vitesse réactionnelle au cours de l'hydrolyse.

Par ailleurs, pour les systèmes Pronase SG/Globuline et Alcalase 2,4L/Albumine, Km* semble décroître exponentiellement en fonction du DH tandis que, pour le système Alcalase 2,4L/Globuline, Km* reste constant aux alentours de 9 g/L (figure III.11.b). La diminution de la valeur de Km* avec l'avancement de la réaction signifierait un accroissement de l'affinité

de l'enzyme envers les peptides formés ; d'après Adler-Nissen (1986), elle pourrait refléter plutôt une meilleure disponibilité des liaisons peptidiques pour l'enzyme. En effet, au début de la réaction, les protéines possèdent une structure tridimensionnelle qui peut limiter l'accessibilité de l'enzyme vers les liaisons peptidiques clivables situées au cœur de la protéine, puis au cours de la réaction, la protéine se déstructure suite à l'hydrolyse de quelques liaisons peptidiques, libérant alors des liaisons initialement inaccessibles. Si l'on considère que l'enzyme est saturée par le substrat pour des concentrations de ce dernier supérieures à 4 fois la valeur du Km*, alors il existe une saturation de l'enzyme par le substrat tout au long de l'hydrolyse pour des ratios Eo/So inférieurs à :

- 2 % (v/p) pour le système Alcalase 2,4L/Globuline,
- 1 % (v/p) pour le système Alcalase 2,4L/Albumine,
- 0,3 % (p/p) pour le système Pronase SG/Globuline.

Toutefois, la diminution de Vm* ou de Km* avec le DH peut également traduire des phénomènes d'inhibition non-compétitive ou incompétitive de l'enzyme par certains produits réactionnels.

III.3.1.3. Inhibition enzymatique par les produits « finaux » de l'hydrolyse.

La présence éventuelle d'une inhibition de l'enzyme par les produits de l'hydrolyse a été évaluée en hydrolysant le substrat, originel, en présence de substrat pré-hydrolysé de DH élevé, ce dernier constituant l'« inhibiteur » potentiel. Une valeur de DH proche du DH maximal a été choisie pour les « inhibiteurs » car nous avons considéré qu'un peptide produit au cours de l'hydrolyse et inhibant l'enzyme reste stable tout au long de la réaction. Les « inhibiteurs » sont des hydrolysats de DH 25,2 %, 21,2 % et 21,7 % respectivement pour les systèmes Alcalase 2,4L/Globuline, Pronase SG/Globuline et Alcalase 2,4L/Albumine. Nous avons alors déterminé les constantes cinétiques apparentes de chaque système enzyme/substrat en présence d'une quantité importante d'« inhibiteur » potentiel (9 g/L).

Le tableau III.9 montre que les valeurs de la vitesse maximale apparente et de la constante de Michaelis apparente déterminées en présence d'« inhibiteur », respectivement Vmi et Kmi, ne diffèrent pas significativement de celles en absence d'« inhibiteur », Vm et Km. Il n'existerait donc pas de phénomènes d'inhibition des enzymes par les petits et moyens peptides représentés par les produits finaux de l'hydrolyse.

Tableau III.9 : valeurs des constantes cinétiques en absence d'inhibiteur (Vm et Km) ou en présence d'« inhibiteur » (Vmi et Kmi) à 9 g/L. « Inhibiteurs » = hydrolysat de DH 25,2 % pour le système Alcalase 2,4L/Globuline, hydrolysat de DH 21,2 % pour le système Pronase SG/Globuline et hydrolysat de DH 21,7 % pour le système Alcalase 2,4L/Albumine. Conditions réactionnelles pour la détermination des constantes cinétiques avec l'Alcalase 2,4L : pH 8, 50 °C et Eo = 0,8 mL/L ; avec la Pronase SG : pH 7,7, 37 °C et Eo = 0,084 g/L. Erreur expérimentale inférieure à 15 %.

	Système enzyme/substrat		
	Alcalase 2,4L/Globuline	**Pronase SG/Globuline**	**Alcalase 2,4L/Albumine**
Vm (g/L.h)	17,8	7,8	20,4
Vmi (g/L.h)	16,3	7,1	16,8
Km (g/L)	10,2	6,9	18,6
Kmi (g/L)	11,1	7,3	16,0

III.3.1.4. Inactivation des enzymes au cours de l'hydrolyse.

** Remplacement de l'enzyme par de l'enzyme fraîche.*

Afin de mettre en évidence l'implication d'un phénomène d'inactivation de l'enzyme lors du processus d'hydrolyse, des expériences sont conduites dans lesquelles l'enzyme est remplacée par de l'enzyme fraîche à un temps donné de l'hydrolyse. Pour cela, des hydrolysats sont préparés en arrêtant, par traitement thermique, l'activité de l'enzyme à un temps donné, t. L'hydrolysat est alors hydrolysé à nouveau avec de l'enzyme fraîche dans les mêmes conditions réactionnelles (pH 8, T = 50 °C, Eo = 0,8 mL/L pour l'Alcalase 2,4L et pH 7,7, T = 37 °C, Eo = 0,084 g/L pour la Pronase SG). Nous déterminons le volume de soude ajouté pendant 5 mn (Vol_2), proportionnel à la vitesse initiale de l'hydrolyse atteinte sur le substrat hydrolysé au temps t. Ce volume est alors comparé au volume de soude (Vol_1) qui est ajouté lorsque l'enzyme n'est pas inactivée et remplacée par de l'enzyme fraîche. Le rapport de ces deux volumes (Vol_1/Vol_2) correspond à l'activité résiduelle de l'enzyme dans les conditions de l'hydrolyse et au temps t. En réalisant à différents temps cette expérience, l'activité résiduelle de l'enzyme au cours de l'hydrolyse a pu être déterminée (figure III.13.a).
Pour tous les systèmes enzyme/substrat, les protéases perdent rapidement et de manière intense leur activité au cours de l'hydrolyse.

La représentation de l'inverse de la concentration en enzyme active (E_t) en fonction du temps (figure III.13.b) conduit à des droites. Ceci montrerait que les réactions d'inactivation des enzymes suivent une relation d'ordre 2. L'équation est alors : $1/E_t = k_i \times t + 1/Eo$, avec k_i, constante de vitesse d'inactivation de l'enzyme en L/mL.h ou L/g.h. Le tableau III.10 rassemble les valeurs expérimentales de k_i.

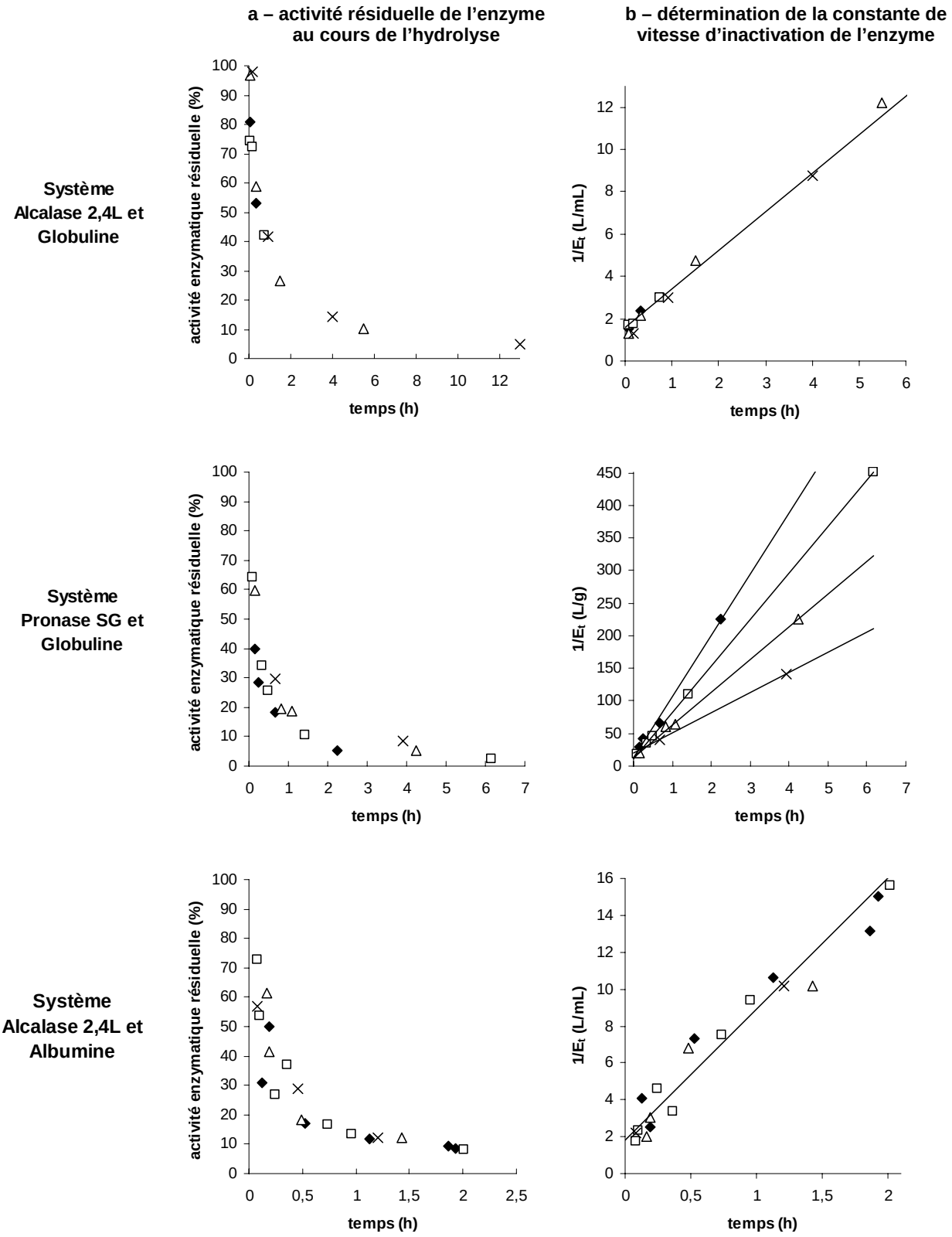


Figure III.13 : (a) Activité résiduelle des protéases au cours de l'hydrolyse de l'isolat de globulines par l'Alcalase (pH 8, 50 °C et Eo = 0,8 mL/L), ou l'isolat de globulines par la Pronase SG (pH 7,7, 37 °C et Eo = 0,084 g/L), ou de l'isolat d'albumines par l'Alcalase 2,4L (pH 8, 50 °C et Eo = 0,8 mL/L). (b) Détermination de l'ordre de la réaction d'inactivation des enzymes et de la constante de vitesse d'inactivation des enzymes. Concentrations initiales en substrat : (♦) 5 g/L, (□) 10 g/L, (Δ) 18,8 g/L, (×) 40 g/L. E_t : enzyme totale active (mL/L ou g/L).

D'après la figure III.13.b et le tableau III.10, la concentration initiale en substrat n'influencerait pas l'inactivation de l'Alcalase 2,4L mais elle semble, par contre, être impliquée dans le phénomène d'inactivation de la Pronase SG. En effet, si So augmente, la valeur de la constante de vitesse d'inactivation de la Pronase SG diminue. Le substrat semble jouer un rôle protecteur vis-à-vis de cette enzyme.

Il est également observé que la nature du substrat protéique influence la vitesse d'inactivation de l'Alcalase 2,4L puisque la valeur de k_i est environ quatre fois plus importante lors de l'hydrolyse des albumines que lors de l'hydrolyse des globulines.

Tableau III.10 : valeurs des constantes de vitesse d'inactivation des protéases, k_i, lors de l'hydrolyse des isolats de protéines de tourteaux de colza. Les valeurs de k_i ont été déterminées par régression linéaire des droites obtenues en traçant $1/E_t = f(t)$.

Protéase	**Isolat protéique (So en g/L)**	**k_i (L/mL.h ou L/g.h)**
Alcalase 2,4L	Globuline (10 – 40 g/L)	1,86
Alcalase 2,4L	Albumine (10 – 40 g/L)	7,53
Pronase SG	Globuline (5 g/L)	94,4
Pronase SG	Globuline (10 g/L)	71,1
Pronase SG	Globuline (18,8 g/L)	50,6
Pronase SG	Globuline (40 g/L)	31,2

* *Test de Selwyn.*

Afin de mieux étudier ces phénomènes d'inactivation des protéases, le test de Selwyn a été utilisé. Il consiste à tracer les courbes Eo × t en fonction du DH (figure III.14).

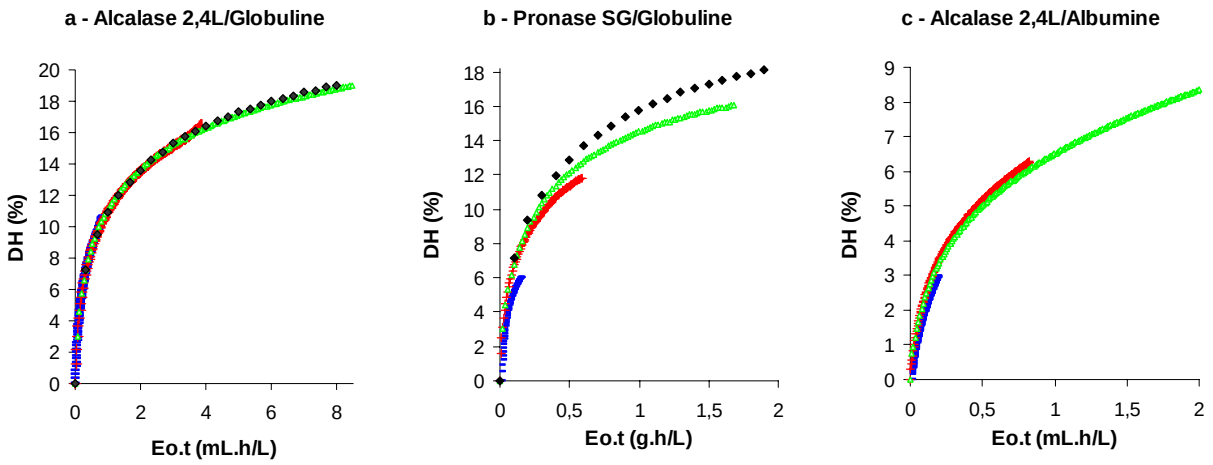


Figure III.14 : tests de Selwyn pour différents systèmes enzyme/substrat : (a) Alcalase 2,4L/Globuline avec pH = 8, T = 50 °C et So = 40 g/L ; (b) Pronase SG/Globuline avec pH = 7,7, T = 37 °C et So = 40 g/L ; (c) Alcalase 2,4L/Albumine avec pH = 8, T = 50 °C et So = 81 g/L. Concentrations initiales en enzymes : pour l'Alcalase 2,4L : (–) Eo = 0,06 mL/L, (+) Eo = 0,28 mL/L, (▲) Eo = 0,8 mL/L, (♦) Eo = 4 mL/L ; pour la Pronase SG : (–) Eo = 0,02 g/L, (+) Eo = 0,084 g/L, (▲) Eo = 0,24 g/L, (♦) Eo = 1,2 g/L.

Pour les systèmes avec l'Alcalase 2,4L (figures III.14.a et III.14.c), les courbes DH en fonction de Eo × t se superposent parfaitement, quelle que soit la valeur de Eo ; le test de Selwyn est positif. Ceci montre, que, lors de l'hydrolyse à 50 °C des isolats protéiques par l'Alcalase 2,4L, cette dernière s'inactive, en fait, selon une réaction d'ordre 2 et non pas d'ordre 1. Le phénomène susceptible d'expliquer cette perte d'activité de l'enzyme serait un phénomène d'autolyse. Un tel résultat concorderait avec les résultats précédents (figure III.13).

Toutefois, nous avons préalablement observé que l'Alcalase 2,4L seule s'inactivait à 50 °C par dénaturation thermique (figure III.5, p. 180). Il est possible que, lors de l'hydrolyse, le substrat stabilise la structure tertiaire de l'Alcalase 2,4L sous l'effet de la chaleur, lui évitant un dépliement thermique irréversible responsable d'une perte d'activité.

La figure III.14.b montre que le test de Selwyn est négatif pour le système Pronase SG/Globuline (avec So = 40 g/L, pH = 7,7 et T = 37 °C), suggérant une inactivation d'ordre 1 de cette enzyme au cours de l'hydrolyse. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec les résultats antérieurs. En effet :

- lors de l'étude sur la dénaturation des enzymes (figure III.5, p. 180), nous avons montré qu'à 37 °C, la Pronase SG seule ne s'inactive pas ou très peu par dénaturation thermique ;
- et, nous avons également montré (paragraphe III.3.1.4, p. 198) qu'au cours de l'hydrolyse, la Pronase SG semblait perdre son activité selon une réaction d'ordre 2 dans laquelle le substrat serait impliqué.

Il est probable que la Pronase SG se déstructure à cause des forces de cisaillement provoquée par l'agitation du réacteur, et ainsi qu'elle perde son activité par dénaturation mécanique.

** Solubilisation des enzymes seules dans les conditions d'hydrolyse.*

Afin de mettre en évidence l'existence ou non d'un éventuel phénomène d'autolyse ou de déstructuration des enzymes, nous avons réalisé différentes mesures. Tout d'abord, nous avons solubilisé les enzymes seules dans un réacteur thermostaté de 100 mL au pH, à la température et à la concentration utilisés pour les hydrolyses (pH = 8, T = 50 °C, Eo = 4 mL/L, durée = 3 h pour l'Alcalase 2,4L ; pH 7,7, T = 37 °C, Eo = 1,2 g/L, durée = 3 h pour la Pronase SG). A l'aide d'un système pH-Stat, le volume de soude 0,5 N ajouté afin de maintenir le pH constant au cours des trois heures de solubilisation des enzymes est

enregistré. Cet ajout de soude pourrait provenir d'une autolyse ou déstructuration des protéases. C'est pourquoi, des expériences similaires ont également été effectuées en présence de 0,5 g/L de PMSF (Fluorure de phényl méthanesulfanyl) qui est un puissant inhibiteur des protéases à sérine. Les résultats de la figure III.15 font apparaître un ajout de soude au cours de la solubilisation des deux enzymes (en 3 h, V_{NaOH} de 0,036 mL pour la pronase SG et de 0,1 mL pour l'Alcalase 2,4L). Ceci montre qu'il y a une dégradation des protéases mais, d'après les volumes de soude ajoutés, ce phénomène serait bien moindre pour ce qui concerne la Pronase SG. En présence de PMSF, l'addition de soude diminue fortement, ce qui montrerait qu'un phénomène d'autolyse serait effectivement responsable de la dégradation des enzymes, lequel serait plus important pour l'Alcalase 2,4L que pour la Pronase SG.

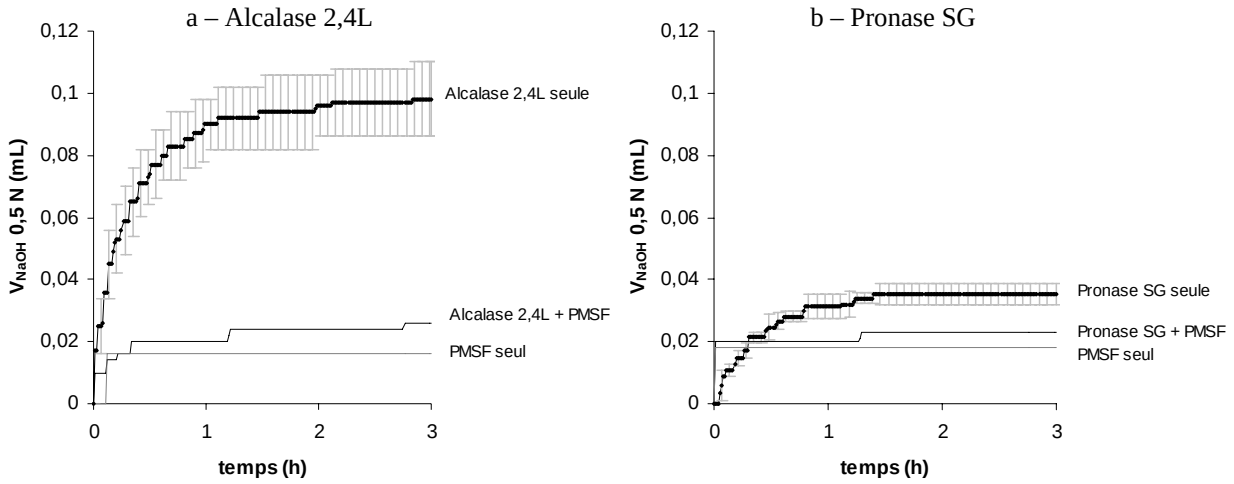


Figure III.15 : solubilisation des protéases à pH constant grâce à la méthode du pH-Stat. (a) Alcalase 2,4L à 4 mL/L, à pH 8 et 50 °C ; (b) Pronase SG à 1,2 g/L, à pH 7,7 et 37 °C, en présence ou non de PMSF, un inhibiteur des protéases à sérine, à 0,5 g/L.

Nous avons alors analysé les protéases solubilisées, par CLHP-ET, et nous avons comparé les chromatogrammes obtenus avec ceux de l'enzyme solubilisée quelques minutes (≈ 5 mn). Les chromatogrammes d'exclusion de taille sont présentés dans la figure III.16.

La taille moléculaire de l'Alcalase 2,4 L et de la Pronase SG sont, d'après les fabricants, respectivement de 27500 Da et de 20000 – 22000 Da (Yoshida *et al.*, 1988). Ainsi, d'après les chromatogrammes d'exclusion de taille, les pics correspondants aux enzymes sont situés entre 14 et 18 mn. Les chromatogrammes des enzymes présentent également des pics après 25 mn, montrant alors la présence de petites molécules de taille moléculaire inférieure à 1 kDa. Ces molécules pourraient être soit des fragments des enzymes qui se seraient dégradées lors de

leurs préparations, soit des molécules ajoutées dans les préparations enzymatiques par les fabricants afin d'améliorer la conservation des enzymes.

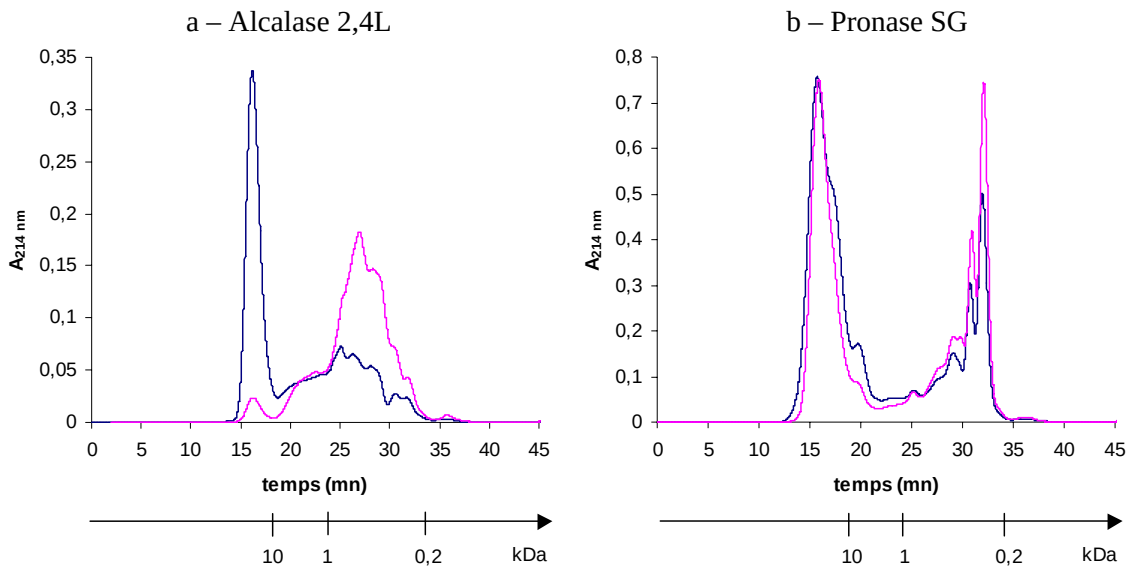


Figure III.16 : profils chromatographiques par CLHP-ET des protéases solubilisées 5 min (——) ou 3 h (——). Protéases : (a) Alcalase 2,4L et (b) Pronase SG.

Lorsque les protéases sont solubilisées 3 h, seules, dans les conditions opératoires de l'hydrolyse, le chromatogramme de l'Alcalase 2,4L est fortement modifié alors que celui de la Pronase SG n'évolue quasiment pas. En effet, le pic à 16 mn caractérisant l'Alcalase 2,4L disparaît presque totalement après 3 heures alors qu'à l'inverse, la proportion des petits peptides (tr > 25 mn) augmente considérablement. Ces résultats montrent que l'Alcalase 2,4L est certainement clivée en fragments plus petits. Ainsi, il semblerait que l'Alcalase 2,4L soit capable de s'autolyser au cours de la réaction. Par contre, la Pronase SG ne semble pas être dégradée en fragments plus petits ; elle ne semble pas s'autolyser mais il est possible que le clivage de quelques-unes de ses liaisons peptidiques puisse altérer son action de manière irréversible.

III.3.1.5. Conclusion sur les phénomènes impliqués dans la protéolyse.

Les résultats précédents nous ont permis de caractériser les phénomènes susceptibles de limiter l'hydrolyse des protéines de colza par l'Alcalase 2,4L ou la Pronase SG. Le tableau III.11 récapitule l'ensemble des résultats concernant ces phénomènes.

Tableau III.11 : phénomènes susceptibles d'être impliqués dans la protéolyse des systèmes enzyme/substrat suivants : Alcalase 2,4L/Globuline, Pronase SG/Globuline et Alcalase 2,4L/Albumine. ind. : indéterminé.

Phénomène étudié	Système enzyme/substrat		
	Alcalase 2,4L Globuline	Pronase SG Globuline	Alcalase 2,4L Albumine
Lié au substrat			
Phénomènes d'inhibition de l'enzyme			
Inhibition par le substrat protéique	non	non	non
Inhibition par les produits d'hydrolyse	non	non	non
Variation de la nature du substrat au cours de l'hydrolyse			
Variation de Vm*	oui	oui	oui
Variation de Km*	non	oui	oui
Lié à l'enzyme			
Présence de plusieurs isoformes ou plusieurs protéases	oui	non	oui
Dénaturation thermique de l'enzyme (50 °C ou 37 °C selon l'enzyme)	oui	non	oui
Inactivation d'ordre 2 au cours de l'hydrolyse	oui	oui	oui
Autolyse	oui	ind.	oui
Influence de la concentration initiale en substrat	non	oui	non

Lors de l'avancement de la réaction, l'Alcalase 2,4L, qui est composée de plusieurs isoformes ou de plusieurs protéases de natures différentes, s'inactiverait par autolyse et serait de moins en moins réactive à l'encontre du substrat au fur et à mesure que ce dernier est hydrolysé. L'Alcalase est sensible à la chaleur mais le substrat semble la protéger. Aucun phénomène d'inhibition par le substrat ou les produits d'hydrolyse ne semble affecter son activité.

Comme l'Alcalase 2,4L, la Pronase SG, qui est une enzyme pure, serait de moins en moins réactive envers le substrat à mesure que ce dernier est hydrolysé. Elle ne serait pas inhibée par le substrat ou les produits d'hydrolyse et perdrait son activité au cours de l'hydrolyse. Toutefois, les phénomènes entraînant sa perte d'activité ne sont pas clairement élucidés ; elle s'inactiverait, en partie, suivant une réaction d'ordre 2 dans laquelle le substrat serait impliqué, mais, à 37 °C, elle ne s'inactiverait pas suite à une dénaturation thermique.

III.3.2. Modélisation phénoménologique des cinétiques d'hydrolyse.

Dans cette partie, plusieurs modèles de connaissance, basés sur le schéma réactionnel de Michaelis-Menten, ont été construits afin de simuler l'hydrolyse enzymatique, en réacteur discontinu, d'isolats de protéines de colza par l'Alcalase 2,4L ou par la Pronase SG. Ces modèles visent à prédire l'évolution temporelle du volume de soude ajouté ou du DH dans une réaction à pH et à température régulés mais pour différentes concentrations initiales en enzyme, Eo, et en substrat, So.

III.3.2.1. Cinétiques d'hydrolyse.

Le schéma de la réaction d'hydrolyse est supposé être le suivant :

$$\mathbf{E_A + S_R} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathbf{E_A S_R} \xrightarrow{k_2} \mathbf{E_A + P}$$

Avec : E_A, l'enzyme active,
S_R, le substrat « hydrolysable »,
E_AS_R, le complexe enzyme-substrat,
P, le produit,
k_1, k_{-1}, k_2, les constantes de vitesse.

Le substrat « hydrolysable », *S_R*, correspond au substrat protéique susceptible d'être hydrolysée parmi la totalité de la matière protéique (*So*). La concentration en substrat « hydrolysable » est définie par la formule suivante :

$$\mathbf{S_R = So \,.\, (DH_{lim} - DH) / 100} \qquad (1)$$

S_R : concentration en substrat protéique hydrolysable (g/L),
So : concentration initiale en protéines (g/L),
DH : degré d'hydrolyse (%),
DH_{lim} : degré d'hydrolyse maximal de l'hydrolyse (%).

En considérant que le milieu réactionnel est homogène en réactifs et parfaitement agité, et sous l'hypothèse d'un état pseudo-stationnaire pour la forme complexée E_AS_R, la vitesse globale de la réaction d'hydrolyse, *r*, définie comme étant la quantité de substrat « hydrolysable » disparue par unité de temps, est définie par la relation suivante :

$$\mathbf{r = -\frac{dS_R}{dt} = k_2 \cdot \frac{E \,.\, S_R}{Km_R + S_R}} \qquad (2)$$

r : vitesse globale de la réaction d'hydrolyse (g/L.h),
k_2 : constante de vitesse (h^{-1}),
S_R : concentration en substrat protéique hydrolysable (g/L),
Km_R : constante de Michaelis définie par rapport à S_R (g/L),
E : concentration en enzyme totale active (mL/L ou g/L selon l'enzyme).

E représente la concentration en enzyme totale active (mL/L ou g/L), sous toutes ses formes dans le milieu : $\mathbf{E = E_A + E_AS_R}$.

La vitesse globale de l'hydrolyse du substrat « hydrolysable » est proportionnelle à la vitesse du volume de soude ajouté dans le milieu réactionnel pour conserver le pH constant :

$$\mathbf{-\frac{dS_R}{dt} = A \,.\, \frac{dV_{NaOH}}{dt}} \qquad (3)$$

S_R : concentration en substrat protéique hydrolysable (g/L),
V_{NaOH} : volume de soude ajouté (mL),
A : coefficient d'équivalence entre S_R et V_{NaOH} (g/L.mL).

Or, le volume de soude est directement proportionnel au DH suivant la relation :

$$\mathbf{DH = \frac{B}{S_o} \cdot V_{NaOH}} \qquad (4)$$

Avec : $$\mathbf{B = \frac{1000}{alpha \,.\, h_{tot} \,.\, Vol} \,.\, 100}$$

D'où : $$\frac{dV_{NaOH}}{dt} = \frac{S_o}{B} \cdot \frac{dDH}{dt} \qquad (5)$$

DH : degré d'hydrolyse (%),
V_{NaOH} : volume de soude ajouté (mL),
B : coefficient de proportionnalité entre le DH et V_{NaOH},
So : concentration initiale en protéine (g/L),
alpha : coefficient de dissociation des groupements α-aminés,
h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques du substrat protéique (méqv/g protéine),
Vol : volume du mélange réactionnel (mL)

Finalement, le bilan instantané en volume de soude et du DH dans le réacteur discontinu peut s'écrire :

$$\frac{dV_{NaOH}}{dt} = \frac{k_2}{A} \cdot \frac{E \,.\, (So \,.\, (DH_{lim} - DH) / 100)}{Km_R + (So \,.\, (DH_{lim} - DH) / 100)} \qquad (6)$$

et,

$$\frac{dDH}{dt} = \frac{B \,.\, k_2}{A \,.\, S_o} \cdot \frac{E \,.\, (So \,.\, (DH_{lim} - DH) / 100)}{Km_R + (So \,.\, (DH_{lim} - DH) / 100)} \qquad (7)$$

III.3.2.2. Expressions et valeurs de k_2 et de Km_R.

Dans l'étude précédente (paragraphe III.3.1.2, p. 195), nous avons mis en évidence une évolution des paramètres cinétiques apparents, Vm (en g/L.h) et Km (g/L), au fur et à mesure que le substrat est hydrolysé. La variation de Km en fonction du DH (en %) est simulée par les équations suivantes :

- pour le système Alcalase 2,4L/Globuline : **Km = 10,7 . DH** ;
- pour le système Pronase SG/Globuline : **Km = 7,3 exp(- 0,053 . DH)** ;
- pour le système Alcalase 2,4L/Albumine : **Km = 19,2 exp (- 0,086 . DH)**.

La variation de Vm en fonction du DH est simulée par les équations qui suivent, les modèles étant présentés dans la figure III.17 :

- pour le système Alcalase 2,4L/Globuline : $\mathbf{Vm = 757 / (7{,}95 + DH)^{1{,}8}}$;
- pour le système Pronase SG/Globuline : $\mathbf{Vm = 612 / (6{,}42 + DH)^{1{,}8}}$;
- pour le système Alcalase 2,4L/Albumine : $\mathbf{Vm = 7{,}94 / (0{,}55 + DH)^{0{,}3}}$.

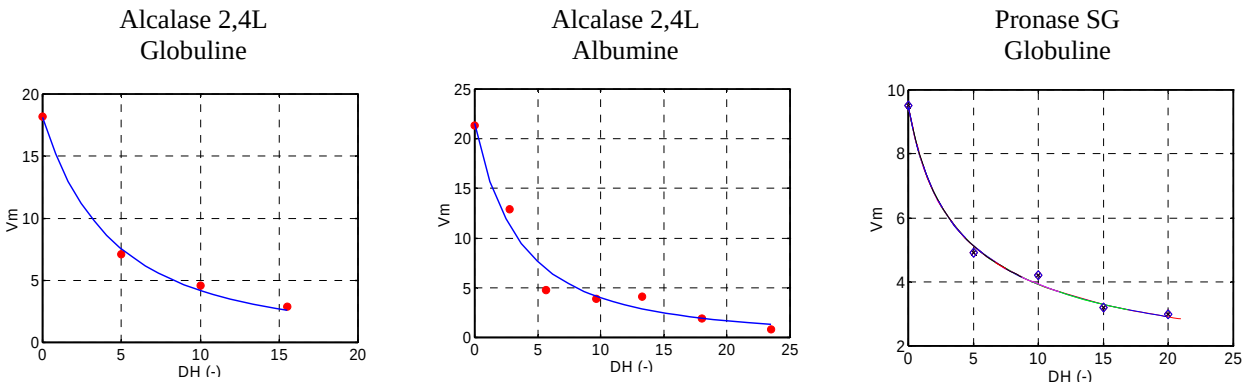


Figure III.17 : évolution de Vm en fonction du DH pour les différents systèmes enzyme/substrat. (●) : points expérimentaux. (—) : courbes de simulation.

Toutefois, ces paramètres cinétiques ont été déterminés en utilisant la concentration totale en protéine (S). Or, les modèles sont construits à partir des valeurs de Km qui tiennent compte de la concentration en substrat hydrolysable (Sr), noté Km_R et exprimé en g/L. Km et Km_R sont liés par la formule suivante : $\mathbf{Km_R = DH_{lim} \cdot Km}$.

De même, les modèles sont construits à partir de la constante cinétique k_2 et non à partir de Vm. Or :

$$\mathbf{Vm = k_2 \cdot Eo}$$

d'où,

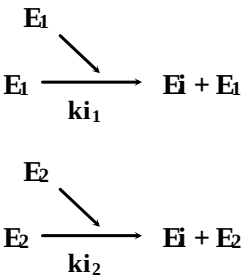
$$\mathbf{k_2 = Vm / Eo}$$

Vm : vitesse maximale (g/L.h),
k_2 : constante cinétique (h^{-1}),
Eo : concentration initiale en enzyme (g/L.mL)
Eo = 0,8 mL/L pour les systèmes avec l'Alcalase 2,4L,
Eo = 0,084 g/L pour le système avec la Pronase SG..

III.3.2.3. Inactivation des enzymes.

- *Inactivation de l'Alcalase 2,4L.*

D'après les résultats expérimentaux, l'Alcalase 2,4L est supposée être composée de deux populations d'enzymes (E_1 et E_2) capable chacune de s'autolyser. Le schéma réactionnel supposé est le suivant :



ki_1 : constante d'inactivation de l'enzyme n° 1 (L/mL.h),
ki_2 : constante d'inactivation de l'enzyme n° 2 (L/mL.h),
E_1 : première population d'enzymes actives (enzyme n° 1),
E_2 : deuxième population d'enzymes actives (enzyme n° 2),
Ei : enzyme inactive (autolysée).

Avec : $\mathbf{E_1(0) + E_2(0) = Eo}$

$\mathbf{E_1(0) = \Omega \cdot Eo}$

$\mathbf{E_2(0) = (1 - \Omega) \cdot Eo}$

$E_1(0)$: concentration initiale de l'enzyme n° 1 (mL/L),
$E_2(0)$: concentration initiale de l'enzyme n° 2 (mL/L),
Eo : concentration initiale totale en enzyme (mL/L)
Ω : fraction de l'enzyme n° 1 (%)
k_i : constante d'inactivation (L/mL.h),
E_1 : concentration de l'enzyme active n° 1 (mL/L),
E_2 : concentration de l'enzyme active n° 2 (mL/L).

D'où :

$$\frac{dE_1}{dt} = -\,ki_1 \cdot E_1^2 \quad \text{et} \quad \frac{dE_2}{dt} = -\,ki_2 \cdot E_2^2$$

- *Inactivation de la Pronase SG.*

D'après les résultats expérimentaux (paragraphe III.3.1.4, p. 198), la Pronase SG ne serait composée que d'une population d'enzyme (E) capable de s'autolyser et/ou de se déstructurer partiellement. Le schéma réactionnel, qui a permis d'obtenir les meilleurs résultats, est le suivant :

- une fraction, θ, de l'enzyme s'autolyse avec une constante de vitesse ki (en L/g.h),
- l'autre fraction (1-θ) de l'enzyme se déstructure (probablement à cause des contraintes de cisaillement provoquées par l'agitation du réacteur) perdant alors son activité suivant une réaction du premier ordre de constante de vitesse kd (en h^{-1}).

$$\mathbf{E + E \xrightarrow[ki]{} Ei + E} \quad \text{et} \quad \mathbf{E \xrightarrow[kd]{} Ei}$$

D'après les résultats précédents, le substrat serait capable de protéger l'enzyme contre son autolyse. Ceci se traduirait par une constante d'inactivation qui serait fonction de la concentration initiale en substrat par la formule suivante : $\mathbf{ki = a \cdot So^{-b}}$

Ainsi :

$$\frac{dE}{dt} = -\,[\theta \cdot (a \cdot So^{-b}) \cdot E^2] - [(1 - \theta) \cdot kd \cdot E]$$

III.3.2.4. Identification paramétrique.

Les paramètres :

- A, ki_1, ki_2 et Ω pour les systèmes avec l'Alcalase 2,4L,
- A, a, b, kd et θ pour le système avec la Pronase SG,

ont été identifiés à partir des mesures expérimentales du volume de soude et du DH pour l'ensemble des expériences. Pour cette identification, un critère J de type moindres carrés a

été défini. Ce critère (fonction écart modèle-expérience) est minimisé (J_{opt}) en utilisant une méthode d'optimisation directe de type Simplexe. L'intégration des équations du modèle nécessaire à l'évaluation de ce critère est effectuée par une méthode de Runge-Kutta d'ordre 4.

L'identification des valeurs des paramètres a conduit aux résultats des tableaux III.12, III.13 et III.14. Les courbes comparatives des profils temporels du volume de soude ou du DH expérimentaux et modélisés sont présentés dans les figures III.18, III.19, III.20 respectivement pour les systèmes Alcalase 2,4L/Globuline, Alcalase 2,4L/Albumine et Pronase SG/Globuline.

Tableau III.12 : résultats de l'identification du modèle du système Alcalase 2,4L/Globuline.

A (g/L.mL)	ki_1 (L/mL.h)	ki_2 (L/mL.h)	Ω (%)	J_{opt}
1,43	6,29	1,62	81,0	0,0044

Tableau III.13 : résultats de l'identification du modèle du système Alcalase 2,4L/Albumine.

A (g/L.mL)	ki_1 (L/mL.h)	ki_2 (L/mL.h)	Ω (%)	J_{opt}
1,91	11,48	3,17	75,1	0,0107

Tableau III.14 : résultats de l'identification du modèle du système Pronase SG/Globuline.

A (g/L.mL)	a	b	kd (h^{-1})	θ (%)	J_{opt}
3,54	324,8	0,163	0,32	32,7	0,0083

Les figures III.18.a, III.19.a et III.20.a montrent que les modèles reproduisent correctement l'évolution temporelle du volume de soude. Ceci se traduit par une très bonne simulation de l'évolution temporelle du DH mais il existe toutefois une légère déviation des courbes modélisées par rapport aux courbes expérimentales pour des concentrations en substrat très faibles (< à 10 g/L) (figures III.18.b, III.19.b et III.20.b). Il est probable que, lorsque la concentration en substrat est très faible, la moindre erreur expérimentale au niveau du volume de soude ajouté se traduise par une importante déviation au niveau du DH.

Les modèles simulent également très bien la perte d'activité des enzymes au cours de la réaction (figures III.18.c, III.19.c et III.20.c) mais la simulation n'est pas tout à fait parfaite pour les systèmes Alcalase 2,4L/Albumine et Pronase SG/Globuline. D'après l'identification paramétrique (tableaux III.12 et III.13), l'Alcalase 2,4L comprendrait entre 75 et 80 % d'une première protéase très sensible à l'autolyse et, en complément, une seconde protéase moins sensible. Par contre, seulement 30 % de la Pronase SG serait capable de s'autolyser ; le reste s'inactivant selon une réaction d'ordre 1 (probablement par déstructuration mécanique).

Alcalase 2,4L / Globuline

A – influence de Eo (So = 40 g/L) **B – influence de So (Eo = 0,8 mL/L)**

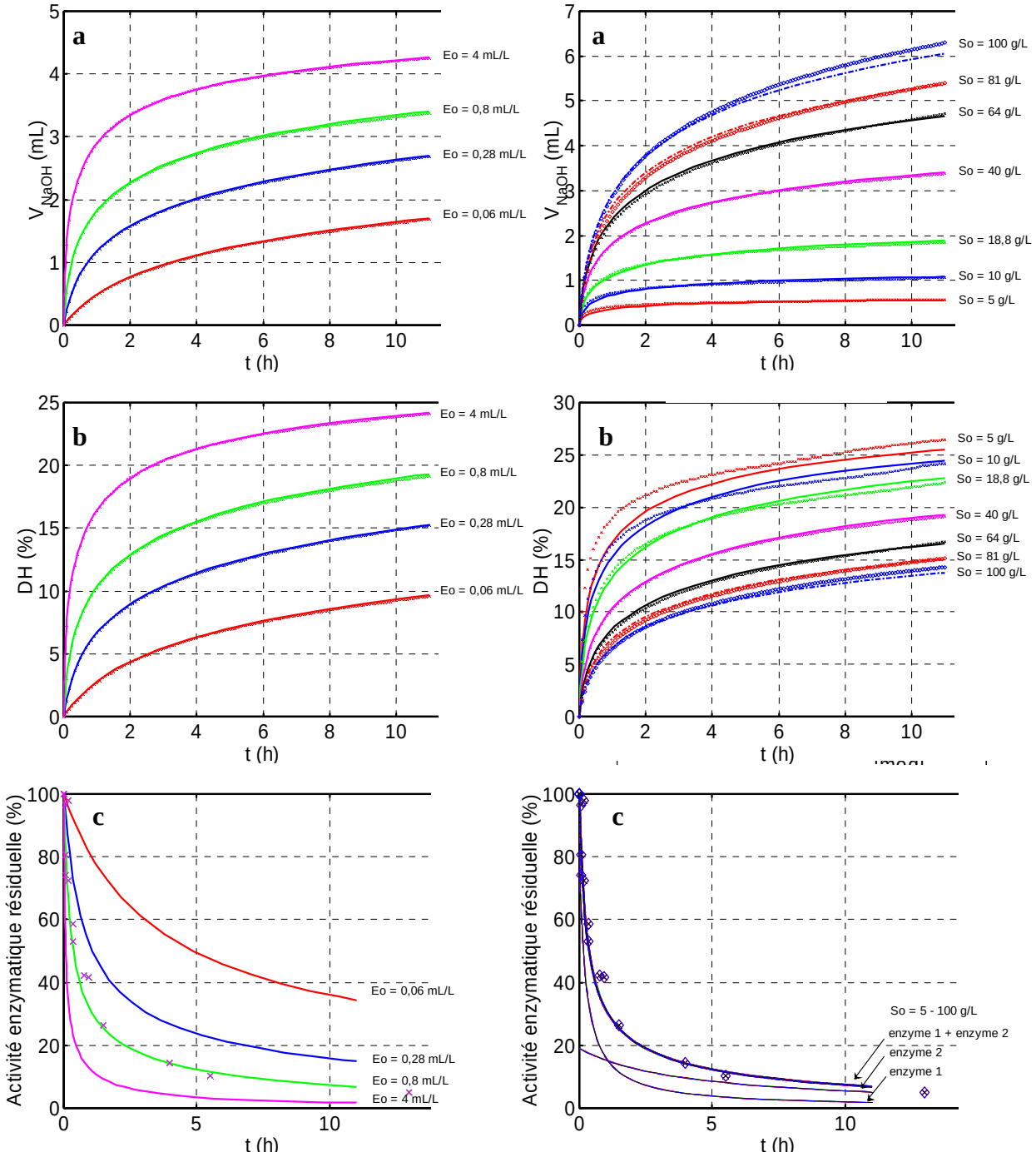


Figure III.18 : modélisation du système Alcalase 2,4L/Globuline : (a) évolution du volume de soude, (b) du degré d'hydrolyse et (c) de l'activité enzymatique résiduelle, (A) en fonction de la concentration initiale en enzyme (avec So = 40 g/L et T = 50 °C) et (B) en fonction de la concentration initiale en substrat (avec Eo = 0,8 mL/L et T = 50 °C). Lignes continues : courbes modélisées ; lignes en pointillé, ronds et croix : valeurs expérimentales.

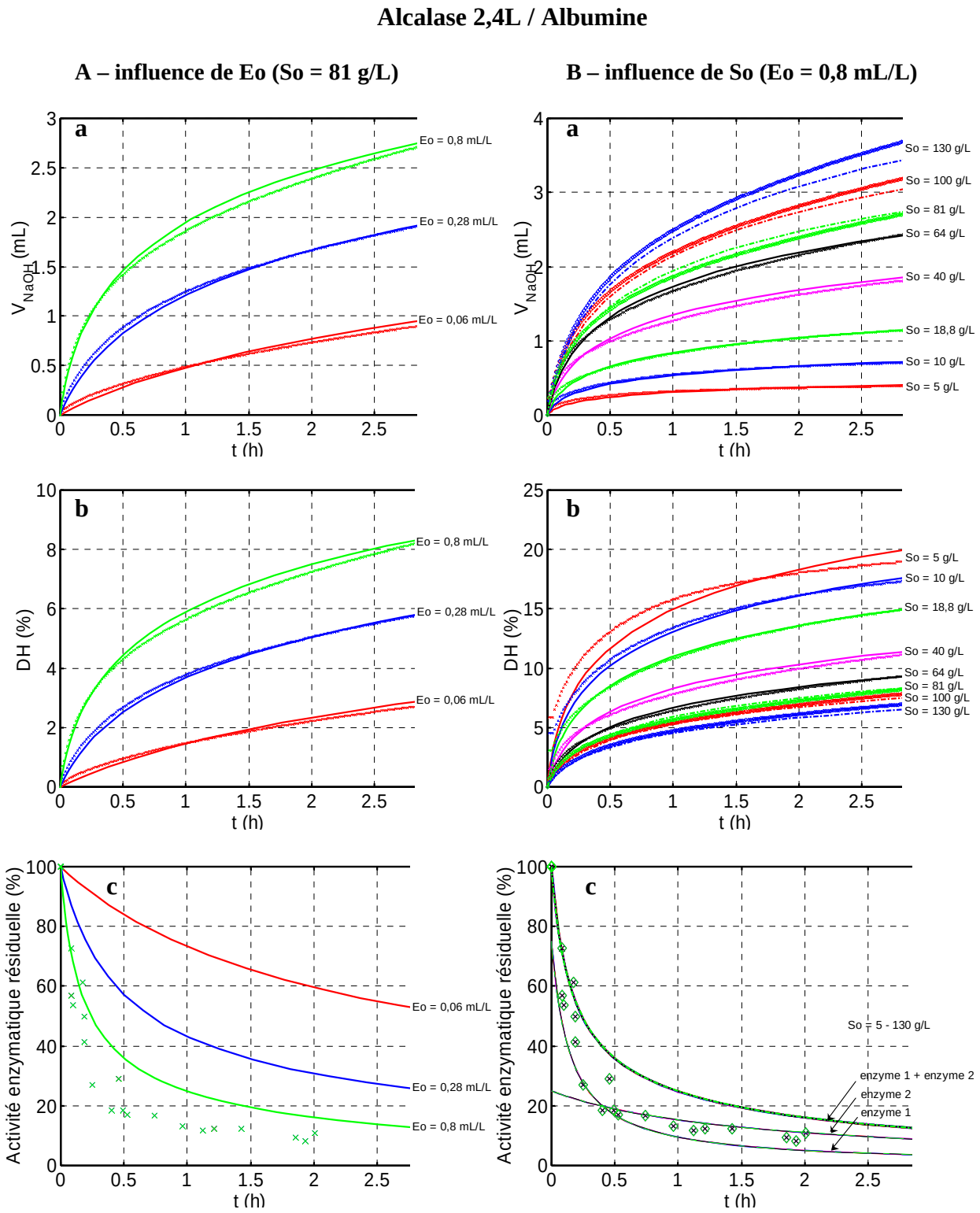


Figure III.19 : modélisation du système Alcalase 2,4L/Albumine : (a) évolution du volume de soude, (b) du degré d'hydrolyse et (c) de l'activité enzymatique résiduelle, (A) en fonction de la concentration initiale en enzyme (avec So = 81 g/L et T = 50 °C) et (B) en fonction de la concentration initiale en substrat (avec Eo = 0,8 mL/L et T = 50 °C). Lignes continues : courbes modélisées ; lignes en pointillé, ronds et croix : valeurs expérimentales.

Pronase SG / Globuline

A – influence de Eo (So = 40 g/L) **B – influence de So (Eo = 0,084 g/L)**

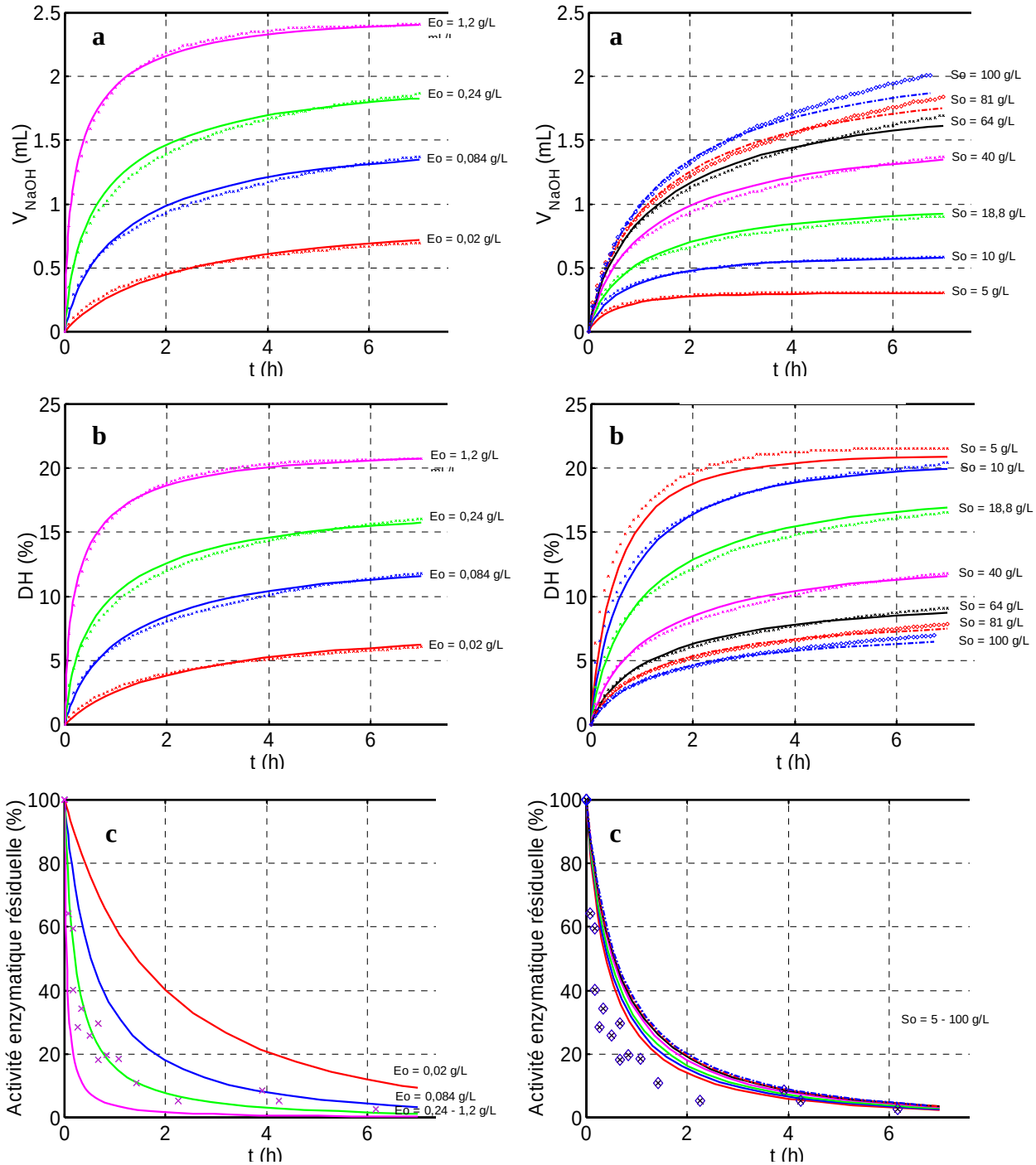


Figure III.20 : modélisation du système Pronase SG/Globuline : (a) évolution du volume de soude, (b) du degré d'hydrolyse et (c) de l'activité enzymatique résiduelle, (A) en fonction de la concentration initiale en enzyme (avec So = 40 g/L et T = 37 °C) et (B) en fonction de la concentration initiale en substrat (avec Eo = 0,084 g/L et T = 37 °C). Lignes continues : courbes modélisées ; lignes en pointillé, ronds et croix : valeurs expérimentales.

En conclusion, la mise en évidence de certains phénomènes impliqués dans le processus de l'hydrolyse des différents systèmes enzyme-substrat, basée sur des constatations expérimentales, a permis de construire des modèles simulant correctement les cinétiques d'hydrolyse *pour un très large domaine* de concentrations initiales en enzyme ou en substrat ; ceci malgré les imprécisions des données sur les préparations enzymatiques (différents types de protéases) et la complexité des substrats (différents types de protéines). La construction du modèle pour le système Pronase SG/Globuline a toutefois nécessité quelques hypothèses concernant son mécanisme d'hydrolyse comme, par exemple, une protection du substrat à l'égard d'une autolyse de l'enzyme.

III.4. CONCLUSION.

Nous avons étudié, pour les systèmes Alcalase 2,4L/Globuline, Pronase SG/Globuline, Alcalase 2,4L/Albumine, l'influence de la concentration initiale en enzyme, de la concentration initiale en substrat, de la température et du pH, d'une part, sur les cinétiques d'hydrolyse et, d'autre part, sur la nature des produits d'hydrolyse.

Les paramètres d'hydrolyse influencent significativement les cinétiques d'hydrolyse mais, nous avons également montré, par CLHP-ET et par CLHP-PI couplée à la spectrométrie de masse, qu'à un DH et à un pH donnés, les propriétés physico-chimiques des hydrolysats (répartition de taille des peptides, rapport hydrophilie/hydrophobie des peptides) et la composition peptidique des hydrolysats (peptides < 1000 Da) sont indépendantes de So, de Eo, de T et de la durée de l'hydrolyse. Ainsi, la production d'un mélange de peptides possédant des propriétés fonctionnelles recherchées peut être contrôlée par seulement deux paramètres : le DH et le pH. C'est pourquoi, la prédiction de l'évolution temporelle du DH, pour des valeurs variables des paramètres opératoires Eo, So et T, a été une méthode judicieuse pour la production de mélanges peptidiques ciblés.

Ceci a été réalisé dans la seconde partie de ce travail ; pour chaque système enzyme/substrat, un modèle phénoménologique basé sur le schéma réactionnel de Michaelis-Menten a été construit afin de simuler les cinétiques d'hydrolyse dans de très larges domaines de concentrations initiales en enzyme ou en substrat. La construction de ces modèles a été réalisée par la mise en évidence de certains phénomènes susceptibles d'être impliqués dans le processus de l'hydrolyse. Pour les systèmes avec l'Alcalase 2,4L (protéase non pure), la diminution de la vitesse réactionnelle avec l'avancement de la réaction semble être provoquée, d'une part, par une diminution de Vm et/ou de Km au cours de l'hydrolyse, et

d’autre part, par une autolyse des enzymes. Le modèle utilisant de telles hypothèses simule correctement les cinétiques expérimentales. Pour le système Pronase SG/Globuline, la réaction d’hydrolyse semble être limitée par plusieurs phénomènes ; une diminution de Vm et de Km, une autolyse de l’enzyme dans laquelle le substrat aurait un rôle protecteur et une perte de l’activité de l’enzyme qui serait d’ordre 1 (probablement une déstructuration de l'enzyme due à l'agitation). Le modèle prenant en compte l’ensemble de ces hypothèses simule également très bien les cinétiques expérimentales d’hydrolyse.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

Grâce à leurs propriétés fonctionnelles, nutritionnelles et biologiques potentielles, les peptides intéressent les industriels de l'alimentaire, de la pharmacie et plus largement des domaines biotechnologiques. Les peptides végétaux sont d'autant plus intéressants qu'ils sont issus d'une matière renouvelable peu coûteuse et qu'ils présentent un risque moindre de transmission d'agents pathogènes imputables aux protéines d'origine animale. Ainsi, depuis une quinzaine d'années, de nombreux travaux portent sur l'hydrolyse enzymatique de protéines végétales mais peu d'entre eux ont été entrepris sur l'hydrolyse de protéines de tourteaux de colza, qui est pourtant, à l'heure actuelle, un co-produit de l'industrie huilière, simplement utilisé dans l'alimentation animale.

Dans ce contexte, ce travail avait pour objectif premier d'étudier l'obtention de tels peptides d'intérêt à partir de tourteaux de colza à travers la mise en œuvre et le développement de procédés de préparation et d'hydrolyse d'isolats protéiques issus de ce résidu industriel. Trois grandes étapes ponctuent ce travail.

Une première phase a concerné l'élaboration, à partir d'une farine de tourteaux de colza, d'un procédé de production d'isolats protéiques qui serviront de substrat pour la génération d'hydrolysats fonctionnels ou biologiquement actifs.

Le tourteau de colza est une matière végétale relativement riche en protéines mais contenant également des composés non-protéiques susceptibles de limiter l'hydrolyse enzymatique et de modifier les propriétés fonctionnelles des hydrolysats ou l'activité biologique des peptides. Ainsi, la première phase de cette étude a consisté à concentrer les protéines de tourteaux industriels de colza.

Ce travail a permis de développer un procédé de préparation de deux isolats protéiques (pureté en protéines supérieure à 90 %) se différenciant par le type de protéines les constituant ; le premier, appelé globuline, est essentiellement composé de globulines (≈ 75 %) tandis que le deuxième, appelé albumine, est majoritairement constitué de napines. Toutefois, la purification des protéines s'est avérée difficile, liée, d'une part, à la mauvaise solubilisation des protéines, et, d'autre part, à l'élimination délicate des composés antinutritionnels (composés phénoliques et acide phytique).

Le procédé mis en place nécessite quatre étapes principales :

- une pré-extraction de la farine de tourteaux avec un mélange éthanol/eau afin d'éliminer majoritairement les composés phénoliques et l'azote non protéique,
- une extraction basique de la farine obtenue afin de solubiliser les protéines,
- une précipitation isoélectrique de ces protéines afin de récupérer assez sélectivement, d'une part, les globulines et, d'autre part, les albumines,
- la dialyse des deux fractions protéiques précédentes pour éliminer les composés non-protéiques restants.

Ce procédé, réalisé à l'échelle laboratoire, paraît techniquement extrapolable à l'échelle industrielle. Toutefois, par rapport à d'autres procédés élaborés à partir de matière végétale autre que le tourteau de colza (graines de soja par exemple), ce procédé paraît coûteux et ne permet d'extraire qu'un quart des protéines initialement présentes dans la farine. Le moyen de remédier à ses désavantages est de générer des molécules à haute valeur ajoutée à partir des isolats, par exemple des peptides dotés de propriétés fonctionnelles intéressantes ou d'activité(s) biologique(s).

Les deux isolats ne possèdent pas de bonnes propriétés fonctionnelles mais leur hydrolyse partielle par l'Alcalase 2,4L (DH = 5 %) permet d'en améliorer certaines au détriment d'autres. Cette étude a également révélé que les propriétés fonctionnelles des hydrolysats obtenus avec les albumines diffèrent de celles issues des hydrolysats de globulines, montrant alors l'importance de la nature des protéines pour l'élaboration d'hydrolysats fonctionnels.

A partir de ce premier travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. N'ayant utilisé qu'un unique lot de tourteaux, il serait intéressant d'utiliser des tourteaux d'origine différente afin de déterminer l'impact de la composition de la matière première sur les performances du procédé (rendement protéique, pureté protéique, type de protéines constituant l'isolat). De plus, la caractérisation des propriétés fonctionnelles des hydrolysats de protéines de colza au sein d'aliments comme, par exemple, la mayonnaise, la meringue ou les conserves, devrait être effectuée pour valider leurs potentialités en vue d'une exploitation industrielle.

La seconde phase de ce travail a consisté à la comparaison de l'action hydrolytique de sept protéases commerciales différentes afin de sélectionner les protéases les plus actives pour la génération d'hydrolysats composés de peptides actifs.

Cette étape a permis de caractériser et de comparer l'action hydrolytique de sept protéases commerciales différentes sur l'isolat de globulines : une subtilisine Carlsberg (Alcalase 2,4L), trois protéases neutres (Pronase SG, Neutrase 0,8L et Prolyve BS), une papaïne (Lypaïne 6500) et deux subtilisines (Orientase 90N et Espérase 7,5L). Il a été montré que les cinétiques d'hydrolyse, la taille des peptides produits et l'activité biologique des hydrolysats sont significativement influencées par la spécificité de l'enzyme.

La valorisation des hydrolysats a porté sur leur capacité à favoriser la croissance de cellules animales cultivées dans un milieu sans sérum de veau fœtal. Cette application intéresse l'industrie pharmaceutique puisqu'elle s'inscrit dans la nécessité de supprimer les risques de contamination des procédés biotechnologiques par des éléments biologiques d'origine animale (de type prion notamment). En tant qu'additifs, les hydrolysats de DH élevés, composés de plus de 70 % en peptides inférieurs à 1000 Da, sont ceux qui améliorent le plus significativement la densité cellulaire. Ces peptides n'auraient pas uniquement un rôle nutritionnel mais agiraient également comme facteurs de croissance et/ou de survie. Il a été montré que, parmi les protéases utilisées, les hydrolysats issus de la Pronase SG, de l'Alcalase 2,4L ou de l'Orientase 90N sont ceux qui permettent d'améliorer significativement la densité cellulaire maximale. Ainsi, ce travail a permis de mettre en évidence une relation enzyme / DH / propriétés ciblées.

Dans des conditions de pH et de température leur étant les plus favorables, l'Alcalase 2,4L et la Pronase SG sont, d'une part, les protéases les plus actives pour la génération de petits et moyens peptides, et, d'autre part, celles qui génèrent le plus de petits peptides (< 1000 Da) de nature hydrophile ou amphiphile. Ainsi, ces deux enzymes ont été retenues afin d'effectuer une étude plus complète.

Dans tous les cas, plusieurs perspectives peuvent être formulées. Il pourrait être rationnel de mettre en œuvre d'autres procédés intégrés de production – séparation pour l'obtention de petits peptides, comme, par exemple, des procédés d'hydrolyse multi-enzymatique couplés ou non à des techniques membranaires (réacteur à membrane). L'isolement des peptides ayant des effets sur la croissance et la survie des cellules animales par des techniques

chromatographiques ou membranaires et leur identification peuvent également être envisagés afin de mieux caractériser la relation structure/fonction de ces peptides.

La dernière partie de ce travail avait pour objectif de modéliser les cinétiques d'hydrolyse et de caractériser les produits d'hydrolyse en vue d'une prédiction du comportement de l'hydrolyse d'isolats de colza par l'Alcalase 2,4L et la Pronase SG quels que soient les paramètres de l'hydrolyse comme la concentration initiale en enzyme, la concentration initiale en substrat, la température et le pH.

Nous avons montré, d'un côté, que les paramètres d'hydrolyse influencent significativement les cinétiques d'hydrolyse et, d'autre part, qu'à un DH et à un pH donnés, les propriétés physico-chimiques (taille, caractère hydrophobe) des peptides sont indépendantes des concentrations initiales en enzyme et en substrat ainsi que de la température. De fait, la prédiction de l'évolution temporelle du DH, quelles que soient les valeurs de ces paramètres, permet de contrôler la génération d'un mélange peptidique aux propriétés ciblées.
Enfin, un modèle phénoménologique ayant pour base le schéma réactionnel de Michaelis-Menten a été construit afin de simuler les cinétiques d'hydrolyse obtenues dans un réacteur discontinu. Ce schéma est, toutefois, adapté pour prendre en compte dans le cas de l'Alcalase 2,4L : une composition de celle-ci de deux protéases différentes capables chacune de s'autolyser et une modification du substrat avec l'avancement de la réaction entraînant une variation des constantes Vm et Km au cours de l'hydrolyse ; dans le cas de la Pronase SG : une modification du substrat au cours de l'hydrolyse, une autolyse de l'enzyme dans laquelle le substrat aurait un rôle protecteur et une perte d'ordre 1 de l'activité enzymatique. Les modèles obtenus conduisent à un très bon accord entre les données théoriques et expérimentales, cela pour de très larges domaines de concentrations initiales en substrat et en enzyme.

Dans la continuité de ce travail, il pourrait être envisagé de modéliser les cinétiques d'hydrolyse obtenues à différentes températures et à différents pH. Ceci permettrait d'améliorer les modèles déjà élaborés et de pouvoir simuler les cinétiques dans des conditions opératoires très diverses.
Par ailleurs, pour remédier aux problèmes d'autolyse ou de déstructuration des enzymes, il serait nécessaire d'envisager des réacteurs à enzymes immobilisées. Ceci pourrait être une voie d'amélioration du procédé d'hydrolyse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- **Aalbersberg W.I.J. (*1999*).** Peptides derived from industrial proteins and bioactivity. *Industrial Proteins*, 2, 7, 3-5.

- **Adamson N.J., Reynolds E.C. (*1996*).** Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: determination of enzyme specificity. *Enz. Microbial Technol.*, 19, 202-207.

- **Adermann K., John H., Ständker L., Forssmann W.-G. (*2004*).** Exploiting natural peptide diversity: novel research tools and drug leads. *Current Opinion Biotechnol.*, 15, 599-606.

- **Adler-Nissen J. (*1976*).** Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 6, 1090-1093.

- **Adler-Nissen J. (*1978*).** Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food. *Ann. Nutr. Alim.*, 32, 205-216.

- **Adler-Nissen J. (*1979*).** Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 6, 1256-1262.

- **Adler-Nissen J. (*1982*).** Limited enzymatic degradation of proteins: a new approach in the industrial application of hydrolases. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32, 138-156.

- **Adler-Nissen J. (*1986*).** Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Pub., New York.

- **Adler-Nissen J. (*1987*).** Enzymatic hydrolysis of proteins in food. A-5901-GB, Novo-Nordisk A/S Novo Allé DK- 2880 Bagsvaerd.

- **Althouse P.J., Dinakar P., Kilara A. (*1995*).** Screening of proteolytic enzymes to enhance foaming of whey protein isolates. *J. Food Sci.*, 60, 5, 1110-1112.

- **Aluko R.E., McIntosh T. (*2005*).** Limited enzymatic proteolysis increases the level of incorporation of canola proteins into mayonnaise. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 6, 2, 195-202.

- **Amarowicz R., Naczk M., Shahidi F. (*2000*).** Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 9, 957-961.

- **Amiot J., Germain L., Turgeon S., Lemay M., Ory-Salam C., Auger F.A. (*2005*).** Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *Int. Dairy J.*, 14, 7, 619-626.

- **AMSOL (*2001*).** Dossier : Point colza 2001.

- **AOAC (*1984*).** Official methods of analysis, 14th ed. In: Association of Official Analytical Chemist, Arlington.

- **Arzú A., Mayorga H., González J., Rolz C. (*1972*).** Enzymatic hydrolysis of cottonseed protein. *J. Agric. Food Chem.*, 20, 4, 805-809.

- **Aubes-Dufau I., Seris J.-L., Combes D. (*1995*).** Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration and characterization. *J. Agric. Food Chem*., 43, 1982-1988.

- **Aymard C., Belardi A. (*2000*).** Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. *Enz. Microb. Technol.*, 27, 612-618.

- **Baek H.H., Cadwallader K.R. (*1995*).** Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *J. Food Sci.*, 60, 5, 929-935.

- **Baudet J.J., Burghart P., Evrard J. (*1988*).** Tourteau à basse teneur en glucosinolates (BTG). Cahier Technique Colza. CETIOM.

- **Bautista J., Hernandez-Pinzon I., Alaiz M., Parrado J., Millan F. (*1996*).** Low molecular weight sunflower protein hydrolysate with low concentration in aromatic amino acids. J. *Agric. Food Chem.*, 44, 967-971.

- **Bautista J., Corpas R., Cremades O., Hernández-Pinzón I., Ramos R., Villanueva A., Sánchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Vioque J., Parrado J., Millán F. (*2000*).** Sunflower protein hydrolysates for dietary treatment of patients with liver failure. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 2, 121-126.

- **Behnke U., Jurisova E., Belajova E., Haas J., Blumhagen H. (*1989*).** Enzymatic hydrolysis of maize protein. *Die Nahrung*, 33, 4, 361-376.

- **Belhocine D., Mokrane H., Grib H., Lounici H., Pauss A., Mameri N. (*2000*).** Optimisation of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor. *Chem. Eng. J.*, 76, 189-196.

- **Bérot S., Briffaud J., Vermeersch G. (*1983*).** Obtention de concentrats de colza. Actes du VIe Congrès international sur le colza, Paris, France, 1407-1411.

- **Bérot S., Compoint J.P., Larré C., Malabat C., Guéguen J. (*2004*).** Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.). *J. Chromatogr. B.*, 818, 1, 35-42.

- **Bitri L. (*2004*).** Optimization study for the production of an opioid-like preparation from bovine casein by mild acidic hydrolysis. *Int. Dairy J.*, 14, 535-539.

- **Biziulevičius G.A., Kislukhina O.V., Žukaitė V., Normantienė T., Arestov I.G. (*2002*).** Stimulation of microbial autolytic system by trypsic casein hydrolysate. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 20, 361-365.

- **Bjurlin M.A., Bloomer S., Nelson C.J. (*2002*).** Characterization of proteolytic activity of proteases. *Biotechnol. Lett.*, 24, 191-195.

- **Blaicher F.M., Elstner F., Stein W., Mukherjee K.D. (*1983*).** Rapeseed protein isolates: effect of processing on yield and composition of protein. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 358-362.

- **Blom W.R., Kunst A., Hakkaart M.J.J., Luli G.W., van Schie B.J. (*1996*).** Peptides for tissue and cell culture media. PCT C12N 5/02, WO 96/26266.

- **Bódi A., Kaslik G., Venekei I., Gráf L. (*2001*).** Structural determinants of the half-life and cleavage site preference in the autolytic inactivation of chymotrypsin. *Eur. J. Biochem.*, 268, 23, 6238-6246.

- **Bombara N., Añón M.C., Pilosol A.M.R. (*1997*).** Functional properties of protease modified wheat flours. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 30, 441-447.

- **Bordenave S., Sannier F., Ricart G., Piot J.M. (*1999*).** Continuous hydrolysis of goat whey in an ultrafiltration reactor: generation of alpha-lactorphin. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 29, 2, 189-202.

- **Bordenave B.S., Sannier F., Ricart G., Piot J.M. (*2000*).** Characterization of a goat whey peptic hydrolysate produced by an ultrafiltration membrane enzymatic reactor. *J. Dairy Res.*, 67, 4, 551-559.

- **Bordenave S., Fruitier I., Ballandier I., Sannier F., Gildberg A., Batista I., Piot J.M. (*2002*).** HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions. Effect on guinea pig ileum and ACE activity. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 32, 1, 65-77.

- **Boudrant J., Cheftel C. (*1976*).** Continuous proteolysis with stabilized protease. II. Continuous experiments. *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1735-1749.

- **Bouhallab S., Henry G., Boschetti E. (*1996*).** Separation of small cationic bioactive peptides by strong ion exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*, 724, 137-145.

- **Brinkmann M., Lütkemeyer D., Gudermann F., Lehmann J. (*2002*).** New technologies for automated cell counting based on optical image analysis 'The Cellscreen'. *Cytotechnology*, 38, 119-127.

- **Cai T., Chang K.-C., Lunde H. (*1996*).** Physicochemical properties and yields of sunflower protein enzymatic hydrolysates as affected by enzyme and defatted sunflower meal. J. *Agric. Food Chem.*, 44, 3500-3506.

- **Ceciliani F., Bortolotti F, Menegatti E., Ronchi S., Ascenzi P., Palmieri S. (*1994*).** Purification, inhibitory properties, amino acid sequence and identification of the reactive site of a new serine proteinase inhibitor from oil-rape (*Brassica napus*) seed. *FEBS Lett.*, 342, 221-224.

- **CETIOM 36. (*1996*).** Oléoscope n°36 : Protéines du colza, quels usages industriels ?

- **CETIOM 44. (*1998*).** Oléoscope n°44 : Les protéines d'oléagineux.

- **Chen M., Rohani S. (*1992*).** Recovery of canola meal proteins by precipitation. *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 63-68.

- **Chen H.-M., Muramoto K., Yamauchi F. (*1995*).** Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β-conglycin. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 574-578.

- **Chen X.-L., Shun C.-Y., Zhang Y.-Z., Gao P.-J. (*2003*).** Rapid monitoring of autolysis process of proteases by capillary electrophoresis. *Biotechnol. Lett.*, 25, 1763-1767.

- **Cheryan M., Deeslie D. (*1983*).** Soy protein hydrolysis in membrane reactors. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 6, 1112-1115.

- **Chiang W.-D., Shih C.-J., Chu Y.-H. (*1999*).** Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chem.*, 65, 189-194.

- **Chobert J.M., Briand L., Guéguen J., Popineau Y., Larré C., Haertlé T. (*1996*).** Recent advances in enzymatic modifications of food proteins for improving their functional properties. *Nahrung*, 40, 4, S.177-182.

- **Church F.C., Porter D.H., Catignani G.L., Swaisgood H.E. (*1985*).** An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *An. Biochem.*, 146, 343-348.

- **Clemente A., Vioque J., Sanchez-Vioque R., Pedroche J., Millán F. (*1999*).** Production of extensive chickpea (Cicer arietinum L.) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3776-3781.

- **Clemente A. (*2000*).** Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 254-262.

- **Constantinides A., Adu-Amankwa B. (*1980*).** Enzymatic modification of vegetable protein: mechanism, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in a batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1543-1565.

- **Cornish-Bowden A., Jamin M., Saks V. (*2004*).** Cinétique enzymatique. EDP Sciences. Portland Press, Ltd. London.

- **Coutouly G. (*1991*).** Génie enzymatique. Chap. 2 : Différents types de réacteurs enzymatiques, Eds Masson, 89-98.

- **Dabrowski K., Sosulski F. (*1983*).** Extraction of phenolic compounds from canola during protein concentration and isolation. In Proceedings 6th International Rapeseed Congress, Paris, 1338-1342.

- **Dagouassat N., Garreau I., Zhao Q., Sannier F., Piot J.M. (*1996*).** Kinetic of in vitro generation of some hemorphins: early release of LVV-hemorphin-7, precursor of VV-hemorphin-7. *Neuropeptides*, 30, 1, 1-5.

- **Dalgalarrondo M., Robin J.M., Azanza J.L. (*1986*).** Subunit composition of the globulin fraction of rapeseed (*Brassica napus L.*). *Plant Sci.*, 43, 115-124.

- **Dalgalarrondo M. (*1986*).** Contribution à l'étude des caractéristiques physico-chimiques des graines de tournesol (*Helianthus annuus L.*) et de colza (*Brassica napus L.*). Thèse Université de Bordeaux.

- **Deeslie W.D., Cheryan M. (*1981*).** Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *J. Food Sci.*, 46, 1035-1042.

- **Deparis V., Durrieu C., Schweizer M., Marc I., Goergen J.L., Chevalot I., Marc A. (*2003*).** Promoting effect of rapeseed proteins and peptides on Sf9 insect cell growth. *Cytotechnol.*, 42, 75-85.

- **Dev D.K., Mukherjee K.D. (*1986*).** Functional properties of rapeseed protein products with varying phytic acid contents. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 775-780.

- **Diniz F.M., Martin A.M. (*1996*).** Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 31, 419-426.

- **Diosady L.L., Tzeng Y.M., Rubin L.J. (*1984*).** Preparation of rapeseed protein concentrates and isolates using ultrafiltration. *J. Food Sci.*, 49, 768-776.

- **Directive du conseil CEE. (*1988*).** Les solvants d'extraction. Directive CEE/88/344, J.O., L 157, 28.

- **Doi E., Shibata D., Matoba T. (*1981*).** Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *An. Biochem.*, 118, 173-184.

- **Doucet D., Otter D.E., Gauthier S., Foegeding E.A. (*2003*).** Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: Peptide identification and determination of enzyme specificity. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6300-6308.

- **Driou A., Saint-Paul F., Paquet D., Le Deaut J.Y., Linder G. (*1985*).** Les protéases non coagulantes dans les industries agro-alimentaires : propriétés biochimiques et applications technologiques. *IAA*, 311-320.

- **Dua S., Mahajan A., Mahajan A. (*1996*).** Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. *Toria*) preparations by chemical modification. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 706-710.

- **Dufossé L., De La Broise D., Guerard F. (*2001*).** Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modelling of microbial growth. *Current Microbiol.*, 42, 32-38.

- **El-Nockrashi A.S., Mukherjee K.D., Mangold H.K. (*1977*).** Rapeseed protein isolates by countercurrent extraction and isoelectric precipitation. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1, 193-197.

- **Epand R.M., Vogel H.J. (*1999*).** Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462, 11-28.

- **Erdmann J.W. Jr, Forbes R.M. (*1981*).** Effects of soya protein on mineral availability. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58, 489-493.

- **Ericson M.L., Rödin J., Lenman M., Glimelius K., Josefsson L.-G., Rask L. (*1986*).** Structure of the rapeseed 1.7S storage protein, napin, and its precursor. *J. Bio. Chem.*, 261, 31, 5, 14576-14581.

- **Fauduet H., Coic J.P., Lessire M., Quinsac A., Ribailler D., Rollin P. (*1995*).** Rapeseed meal upgrading-pilot scale preparation of rapeseed meal materials with high or low glucosinolate contents. *An. Feed Sci. Technol.*, 56, 99-109.

- **Ferreira L., Ramos M.A., Dordick J.S., Gil M.H. (*2003*).** Influence of different silica derivatives in the immobilisation and stabilisation of *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *J. Mol. Cat. B: Enz.*, 21, 189-199.

- **Folawiyo Y.L., Owusu Apenten R.K. (*1997*).** The effect of heat- and acid-treatment on the structure of rapeseed albumin (napin). *Food Chem.*, 58, 3, 237-243.

- **Franěk F., Hohenwarter O., Katinger H. (*2000*).** Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnol. Prog.*, 16, 688-692.

- **Franěk F., Eckschlager T., Katinger H. (*2003*).** Enhancement of monoclonal antibody production by lysine-containing peptides. *Biotechnol. Prog.*, 19, 169-174.

- **Franěk F. (*2004*).** Gluten of spelt wheat (*Triticum aestivum* subspecies *spelta*) as a source of peptides promoting viability and product yield of mouse hybidoma cell cultures. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4097-4100.

- **Friedman M. (*1996*).** Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 6-29.

- **Froidevaux R., Lignot B., Nedjar-Arroume N., Guillochon D., Coddville B., Ricart G. (*2000*).** Kinetics of appearance of hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by a direct coupling of reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 873, 185-194.

- **Froidevaux R., Krier F., Nedjar-Arroume N., Vercaigne-Marko D., Kosciarz E., Ruckebusch C., Dhulster P., Guillochon D. (*2001*).** Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Lett.*, 491, (1-2), 159-163.

- **Frøkjaer S. (*1994*).** Use of hydrolysate for protein supplementation. *Food Technol.*, 86-88.

- **Fukudome S., Yoshikawa M. (*1992*).** Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS Lett.*, 296, 1, 107-111.

- **Fukudome S., Yoshikawa M. (*1993*).** Gluten exorphin C. A novel opioid peptide derived from wheat gluten. *FEBS Lett.*, 316, 1, 17-19.

- **García-Carreño F.L. (*1996*).** Proteinase inhibitors. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 197-204.

- **Ge S.-J., Bai H., Yuan H.-S., Zhang L.-X. (*1996*).** Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor. *J. Biotechnol.*, 50, 161-170.

- **Ghadge R.S., Sawant S.B., Joshi J.B. (*2003*).** Enzyme deactivation in a bubble column, a stirred vessel and an inclined plane. *Chem. Eng. Sci.*, 58, 5125-5134.

- **Gibbs B.F., Zougman A., Masse R., Mulligan C. (*2004*).** Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research Int.*, 37, 123-131.

- **Gill I., López-Fandiño R., Jorba X., Vulfson E.N. (*1996*).** Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enz. Microb. Technol.*, 18, 162-183.

- **Gillberg L., Törnell B. (*1976*).** Preparation of rapeseed protein isolates. Precipitation of rapeseed proteins in the presence of polyacids. *J. Food Sci.*, 41, 1070-1075.

- **Gilmartin L., Jervis L. (*2002*).** Production of cod (*Gadus morhua*) muscle hydrolysates. Influence of combinations of commercial enzyme preparations on hydrolysates peptide size range. J. *Agric. Food Chem.*, 50, 5417-5423.

- **Godel H., Seitz P., Verhoef M. (*1992*).** Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. *LC-GC INTL*, 5, 2, 44-49.

- **Godon B. (*1996*).** Protéines végétales. Eds Lavoisier.

- **Gonçalves N., Vioque J., Clemente A., Sánchez-Vioque R., Bautista J., Millán F. (*1997*).** Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza. *Grasas y Aceites*, 48, 5, 282-289.

- **González-Tello P., Camacho F., Jurado E., Páez M.P., Guadix E.M. (*1994a*).** Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetics models. *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 523-528.

- **González-Tello P., Camacho F., Jurado E., Páez M.P., Guadix E.M. (*1994b*).** Enzymatic hydrolysis of whey proteins: II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 523-528.

- **González-Tello P., Camacho F., Jurado E., Guadix E.M. (*1996*).** A simple method for obtaining kinetic equations to describe the enzymatic hydrolysis of biopolymers. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 67, 286-290.

- **Gueguen J., Bollecker S., Schwenke K.D., Raab B. (*1990*).** Effect of succinylation on some physicochemical and functional properties of the 12S storage protein from rapeseed (*Brassica napus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 38, 61-69.

- **Guérard F., Dufossé L., De La Broise D., Binet A. (*2001*).** Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus alcabares*) wastes using Alcalase. *J. Mol. Cat. B: Enz.*, 11, 1051-1059.

- **Guerard F., Guimas L., Binet A. (*2002*).** Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J. Mol. Cat. B: Enz.*, 19-20, 489-498.

- **Hardwick J.E., Glatz C.E. (*1989*).** Enzymatic hydrolysis of corn gluten meal. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1188-1192.

- **Henn R.L., Netto F.M. (*1998*).** Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3009-3015.

- **Hill R. (*1979*).** A review of the « toxic » effects of rapeseed meals with observations on meal from improved varieties. *Br. Vet. J.*, 135, 3-16.

- **Hsieh C.M., Yang F.-C., Iannotti E.L. (*1999*).** The effect of soy protein hydrolysates on fermentation by Lactobacillus amylovorus. *Process Biochem.*, 34, 173-179.

- **Hühmer A.F.R., Aced G.I., Perkins M.D., Gursoy R.N., Jois D.S.S., Larive C., Siahaan T.J., Schoneich C. (*1997*).** Separation and analysis of peptides and proteins. *Anal. Chem.*, 69, 29R-57R.

- **Info-PROLEA 58 (*2002*).** L'Europe doit offrir une plus grande visibilité aux producteurs.

- **Info-PROLEA 61 (*2003*).** Réforme de la PAC. Les enjeux pour les protéagineux.

- **Jeejeebhoy K.N. (*2000*).** Vegetable proteins: are they nutritionally equivalent to animal protein? *Eur. J. Gastroenterology Hepatology*, 12, 1-2.

- **Jennings D.M., Lewis O.A.M. (*1969*).** Methionine loss during protein hydrolysis of plant material. *J. Agric. Food Chem.*, 17, 3, 668-669.

- **Jang A., Lee M. (*2004*).** Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Sci.*, 69, 4, 653-661.

- **Jensen S.K., Yong-Gang Liu, Eggum B.O. (*1995*).** The effect of heat treatment on glucosinolates and nutritional value of rapeseed meals in rats. *An. Feed Sci. Tech.*, 53, 17-28.

- **Jin D.-H., Zhang Y., Suzuki Y., Naganuma T., Ogawa T., Hatakeyama E., Muramoto K. (*2000*).** Inhibitory effect of protein hydrolysates on calcium carbonate crystallization. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5450-5454.

- **Juffs H.S. (*1975*).** Proteolysis detection in milk. IV. Starch gel electrophoresis and formol titration. *J. Dairy Research*, 42, 277-283.

- **Kammoun R., Fournier F., Le Bonté S., Bejar S., Chevalot I., Marc I. (*2001*).** Construction d'un modèle de l'hydrolyse des protéines de gruau de blé dur par une protéase. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, ISBN 2-910239-61-6, 87, 41-48.

- **Kammoun R., Bejar S., Ellouz R. (*2003*).** Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutrase®. *Biores. Technol.*, 90, 249-254.

- **Kapel R., Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., Fertin-Bazus A., Dhulster P., Guillochon D. (*2003*).** Continuous production opioid peptide LVV-haemorphin-7 (LVVh-7) by peptic hydrolysis of bovine haemoglobin in a continous membrane reactor. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37, 317-324.

- **Kawamura Y., Nakanishi K., Matsuno R., Kamikubo T. (*1981*).** Stability of immobilized α-Chymotrypsin. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1219-1236.

- **Kim S.Y., Park P.S.-W., Rhee K.C. (*1990*).** Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J. Agric Food Chem.*, 38, 651-656.

- **Klockeman D.M., Toledo R., Sims K.A. (*1997*).** Isolation and characterization of defatted canola meal protein. *Am. Chem. Soc.*, 45, 3867-3870.

- **Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A., Rantamäki P., Tupasela T. (*1998*).** Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 307-319.

- **Kozlowska H., Zadernowski R. (*1983*).** Production of protein preparates from rapeseed. Actes du VIe Congrès international sur le colza, Paris, France, 1412-1419.

- **Krause J.-P., Schwenke K.D. (*2001*).** Behaviour of a protein isolate from rapeseed (*Brassica napus*) and its main protein components – globulin and albumin – at air/solution and solid interfaces, and in emulsions. *Col. Sur. B: Bioint.*, 21, 29-36.

- **Kristinsson H.G., Rasco B.A. (*2000a*).** Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and visceral serine protease mixture. *Process Biochem.*, 36, 131-139.

- **Kristinsson H.G., Rasco B.A. (*2000b*).** Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolysed with various alkaline proteases. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 657-666.

- **Kroll J., Kujawa M., Schnaak W. (*1991*).** Preparation of rapeseed proteins by extraction, ultrafiltration and diafiltration. *Fat. Sci. Technol.*, 93, 2, 61-65.

- **Kroll J., Rawel H.M., Seidelmann N. (*2000*).** Physicochemical properties and susceptibility to proteolytic digestion of myoglobin-phenol derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1580-1587.

- **Kuba M., Tana C., Tawata S., Yasuda M. (*2004*).** Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochem.*, 40, 6, 2191-2196.

- **Kukman I.L., Zelenik-Blatnik M., Abram V. (*1995*).** Isolation of low-molecular-mass hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 704, 113-120.

- **Kunitz M., Northrop J.H. (*1934*)**. *J. Gen. Physiol.*, 17, 591-596.

- **Kunst A. (*2000*).** Enzymatic modification of soy proteins to improve their functional properties. *Industrial Proteins*, 3, 8, 9-11.

- **Lacroix M., Amiot J., Bigué N., Brisson G. (*1983a*).** Hydrolyse enzymatique des protéines de colza. Can. Inst. *Food Sci. Technol. J.*, 16, 4, 242-245.

- **Lacroix M., Amiot J., Brisson G.J. (*1983b*).** Hydrolysis and ultrafiltration treatment to improve the nutritive value of rapeseed proteins. *J. Food Sci.*, 48, 1644-1645.

- **Lacroix M., Amiot J., Cheour F., De La Noue J., Goulet G., Brisson G.J. (*1988*).** Effect of methanol/acetone/water extraction and enzymatic hydrolysis on the nutritional value of unheated rapeseed proteins. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 38, 4, 343-353.

- **Lacki K., Duvnjak Z. (*1999*).** A method for the decrease of phenolic content in commercial canola meal using an enzyme preparation secreted by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biotechnol. Bioeng.*, 62, 422-433.

- **Lahl W.J., Braun S.D. (*1994*).** Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, 68-71.

- **Lalasidis G., Sjöberg L.-B. (*1978*).** Two new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with exceptionally high content of essential amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 3, 742-749.

- **Laemmli U.K. (*1970*).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-686.

- **Lathia D., Hoch G., Kievernagel Y. (*1987*).** Influence of phytate on in vitro digestibility of casein under physiological conditions. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 37, 3, 229-235.

- **Lee P.A., Pittam S., Hill R. (*1984*).** The voluntary food intake by growing pigs of diets containing treated rapeseed meals or extracts of rapeseed meals. *Brit. J. Nutr.*, 52, 159-164.

- **Léger L.W., Arntfield S.D. (*1993*).** Thermal gelation of the 12S canola globulin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 853-861.

- **Leckband G., Frauen M., Friedt W. (*2002*).** NAPUS 2000. Rapeseed (*Brassica napus*) breeding for improved human nutrition. *Food Research Int.*, 35, 273-278.

- **Léonil J., Gagnaire V., Mollé D., Pezennec S., Bouhallab S. (*2000*).** Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chromatogr. A*, 881, 1-21.

- **Li G.-H., Le G.-W., Shi Y.-H., Shrestha S. (*2004*).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr. Research*, 24, 469-486.

- **Lin S.-B., Chiang W.-D., Cordle C. T., Thomas R.L. (*1997*).** Functional and immunological properties of casein hydrolysate produced from a two-stage membrane system. *J. Food Sci.*, 62, 3, 480-483.

- **Linder M., Fanni J., Parmentier M., Sergent M., Phan-Tan-Luu R. (*1995*).** Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci.*, 60, 5, 949-958.

- **Liu R.F.K., Thompson L.U., Jones J.D. (*1982*).** Yield and nutritive value of rapeseed protein concentrate. *J. Food Sci.*, 47, 977-981.

- **Liu J., Shi M., Diosady L.L., Rubin L. (*1995*).** Three-phase extraction of Chinese rapeseed using the Karr column. *J. Food Eng.*, 24, 35-45.

- **Mahajan A., Dua S. (*1994*).** Comparaison of processing treatments on the composition and functional properties of rapeseed preparations (*Brassica campestris* L. var *toria*). *Narhung*, 38, 6, 578-587.

- **Mahajan A., Dua S. (*1997*).** Nonchemical approach for reducing antinutritional factors in rapeseed (*Brassica campestris* var. toria) and characterization of enzyme phytase. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2504-2508.

- **Mahajan A., Dua S. (*1998*).** Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var toria) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. *Food Hydrocol.*, 12, 349-355.

- **Mahajan A., Bhardwaj S., Dua S. (*1999*).** Traditional processing treatments as a promising approach to enhance the functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. *toria*) and Sesame seed (*Sesamum indicum*) meals. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3093-3098.

- **Mahajan A., Dua S., Bhardwaj S. (*2002*).** Simple physical treatment as an effective tool to improve the functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. *toria*) and sesame seed (*Sesamum indicum*) meals. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 53, 6, 455-463.

- **Mahmoud M.I. (*1994*).** Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.*, 89-95.

- **Makkar H.P.S., Bluemmel M., Borowy N.K., Becker K. (*1993*).** Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Food Sci. Food Agric.*, 61, 161-165.

- **Maldonado J., Gil A., Narbona E., Molina J.A. (*1998*).** Special formulas in infant nutrition: a review. *Early Human Development*, 53 Suppl., S23-S32.

- **Mar Yust M., Pedroche J., Megías C., Gíron-Calle J., Alaiz M., Millán F., Vioque J. (*2004*).** Rapeseed protein hydrolysates: a source of HIV protease peptide inhibitors. *Food Chem.*, 87, 387-392.

- **Marczak E.D., Usui H., Fujita H., Yang Y.J., Yokoo M., Lipkowski A.W., Yoshikawa M. (*2003*).** New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides*, 24, 791-798.

- **Margot A., Flaschel E., Renken A. (*1994*).** Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Process Biochem.*, 29, 257-262.

- **Margot A., Flaschel E., Renken A. (*1997*).** Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Process Biochem.*, 32, 3, 217-223.

- **Market Y., Koditz J., Mansfeld J., Arnold U., Ulbrich-Hofmann R. (*2001*).** Increased proteolytic resistance of ribonuclease a by protein engineering. *Protein Eng.*, 14, 791-796.

- **Márquez M.C., Fernández V. (*1998*).** Significant process variables in enzymatic hydrolysis of vegetable proteins. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 12, 3, 121-128.

- **Márquez M.C., Vázquez M.A. (*1999*).** Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochem.*, 35, 111-117.

- **Martone C.B., Borla O.P., Sánchez J.J. (*2005*).** Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archea growth media. *Biores. Technol.*, 96, 383-387.

- **Masson P., Tomé D., Popineau Y. (*1986*).** Peptic hydrolysis of gluten, glutelin and gliadin from wheat grain: kinetics and characterisation of peptides. *J. Sci. Food Agric.*, 37, 1223-1235.

- **Mawson R., Heaney R.K., Zdunczyk Z., Kozlowska H. (*1993*).** Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part II. Flavour and palatability. *Die Nahrung*, 37, 4, 336-344.

- **Meisel H. (*1998*).** Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy Journal*, 8, 363-373.

- **Megías C., Del Mar Yust M., Pedroche J., Lquari H., Girón-Calle J., Alaiz M., Millán F., Vioque J. (*2004*).** Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Heliantus annuus* L.) protein isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1928-1932.

- **Mine Y., Ma F., Lauriau S. (*2004*).** Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1088-1094.

- **Mohamad Ramlan B.M.S., Nobuyuki M., Motoyasu A., Naho H., Shiori S., Noboru K., Yasunobu O., Shigeru U. (*2002*).** Comparison of protein chemical and physicochemical properties of rapeseed cruciferin with those of soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7380-7385.

- **Molina Ortiz S.E., Wagner J.R. (*2002*).** Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research Int.*, 35, 511-518.

- **Monsalve R.I., Rodriguez R. (*1990*).** Purification and characterization of proteins from the 2S fraction from seeds of the Brassicae family. *J. Exp. Bot.*, 41, 89-94.

- **Monsalve R.I., Menéndez-Arias L., López-Otín C., Rodríguez R. (*1990*).** β-turns as structural motifs for the proteolytic processing of seed proteins. *FEBS Lett.*, 263, 2, 209-212.

- **Morato A.F., Carreira R.L., Junqueira R.G., Sylvestre M.P.C. (*2000*).** Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Composition Anal.*, 13, 843-857.

- **Moreno M.C.M., Cuadrado V.F. (*1993*).** Enzymatic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochem.*, 28, 481-490.

- **Mossé J. (*1990*).** Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination variation according to species and to seed protein content. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 18-24.

- **Mullally M.M., O'Callaghan D.M., FitzGerald R.J., Donnelly W.J., Dalton J.P. (*1994*).** Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2973-2981.

- **Murphy D.J., Cummins I., Kang A.S. (*1989*).** Immunocytochemical and biological studies of the mobilization of storage oil-bodies and proteins in germinating cotyledons of oilseed rape *Brassica napus*. *J. Sci. Food Agric.*, 48, 209-223.

- **Murphy D.J. (*1996*).** Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *TIBTECH*, 14, 206-213.

- **Mutilangi W.A.M., Panyam D., Kilara A. (*1995*).** Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. *J. Food Sci.*, 60, 5, 1104-1109.

- **Nacer S.A., Sanchez C., Villaume C., Mejean L., Mouecoucou J. (*2004*).** Interaction between β-lactoglobulin and pectins during in vitro gastric hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 355-360.

- **Naczk M., Shahidi F., Sullivan A. (*1992*).** Recovery of rapeseed tannins by various solvent systems. *Food Chem.*, 45, 1, 51-54.

- **Naczk M., Amarowicz R., Sullivan A., Shahidi F. (*1998*).** Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chem.*, 62, 4, 489-502.

- **Nastruzzi C., Cortesi R., Esposito E., Menegatti E., Leoni O., Iori R., Palmieri S. (*1996*).** *In vitro* cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1014-1021.

- **Neves V.A., Lourenço E.J. (*1998*).** Lentil tannin-globulin interaction and *in vitro* hydrolysis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 18, 3, 1-10.

- **Newkirk R.W., Classen H.L. (*1998*).** In vitro hydrolysis of phytate in canola meal with purified and crude sources of phytase. *An. Feed Sci. Technol.*, 72, 315-327.

- **Novozymes (*1979*).** Determination of Neutrase using the Anson haemoglobin method. Analytical method. EB-SM-0348.02/01.

- **Novo Enzymes (*1988*).** Utilisation de l'Alcalase® ou de la Neutrase® de qualité alimentaire, pour l'hydrolyse contrôlée des protéines. Fiche Technique Novo Enzymes.

- **O'Meara G.M., Munro P.A. (*1984*).** Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase. *Meat Sci.*, 11, 227-238.

- **Ohlson R., Anjou K. (*1979*).** Rapeseed protein products. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 56, 431-437.

- **Opiteck G.J., Jorgenson J.W. (*1997*).** Two-dimensional SEC/RPLC coupled to mass spectrometry for the analysis of peptides. *Anal. Chem.*, 69, 2283-2291.

- **Ortiz S.E.M., Añón M.C. (*2000*).** Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates. *J. Agric. Oil Chem. Soc.*, 77, 12, 1293-1301.

- **Palomares O., Monsalve R.I., Rodriguez R., Villalba M. (*2002*).** Recombinant pronapin precursor produced in *Pichia pastoris* displays structural and immunologic equivalent properties to its mature product isolated from rapeseed. *Eur. J. Biochem.*, 269, 2538-2545.

- **Panasiuk R., Amarowicz R., Kostyra H., Sijtsma L. (*1998*).** Determination of α-amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chem.*, 62, 3, 363-367.

- **Panyam D., Kilara A. (*1996*).** Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 120-125.

- **Park K.-J., Hyun C.-K. (*2002*).** Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. *Enz. Microb. Technol.*, 30, 633-638.

- **Parrado J., Millan F., Hernandez-Pinzon I., Bautista J., Machado A. (*1993*).** Sunflower peptones: use as nitrogen source for the formulation of fermentation media. *Process Biochem.*, 28, 2, 109-113.

- **Paulson A.T., Tung M.A. (*1989*).** Thermally induced gelation of succinylated canola protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 319-326.

- **Pedersen B. (*1994*).** Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technol.*, 96-98.

- **Pedroche J., Yust M.M., Lqari H., Girón-Calle J., Alaiz M., Vioque J., Millán F. (*2004*).** *Brassica carinata* protein isolates: chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis. *Food Chem.*, 88, 337-346.

- **Pelmont J. (*1995*).** Enzymes. Catalyseurs du monde vivant. Collection Grenoble Sciences. Eds Pug.

- **Perea A., Ugalde U. (*1996*).** Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. *Enz. Microb. Technol.*, 18, 29-34.

- **Periago M.J., Vidal M.L., Ros G., Rinco F., Martinez C., Lopez G., Rodrigo J., Martinez I. (*1998*).** Influence of enzymatic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour. *Food Chem.*, 63, 71-78.

- **Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T., Korhonen H. (*2000*).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitoty properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Research*, 67, 53-64.

- **Pihlanto-Leppälä A. (*2001*).** Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 347-356.

- **Plietz P., Damaschun G., Muller J.J., Schenke K.D. (*1983*).** The structure of 11S globulin from sunflower and rapeseed. A small angle X-ray scattering study. *Eur. J. Biochem.*, 130, 315-320.

- **Ponnampalam R., Goulet G., Amiot J., Brisson G.J. (*1987*).** Some functional and nutritional properties of oat flours as affected by proteolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 279-285.

- **Postolache C., Oncescu T. (*1989*).** Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalyzed by alcalase. *Revue Roumaine de Chimie*, 34, 2, 581-584.

- **Prevot-D'Alvise N., Lesueur-Lambert C., Fertin-Bazus A., Fertin B., Dhulster P., Guillochon D. (*2004*).** Continuous enzymatic solubilization of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor. *Enz. Microbial Technol.*, 34, 380-391.

- **Raab B., Leman H, Schwenke K.D., Kozlowska H. (*1992*).** Comparative study of the protein patterns of some rapeseed (*Brassica napus L.*) varieties by means of polyacrylamide gel electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Nahrung*, 36, 239-247.

- **Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (*1998*).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. *Mol. Biol. Rev.*, 62, 3, 597-635.

- **Ravallec-Plé R., Van Wormhoudt A. (*2003*).** Secretagogue activities in cod (Gadus morhua) and shrimp (Penaeus aztecus) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumor cells. *Comparative Biochem. Physiol. B*, 134, 669-679.

- **Rohn S., Rawel H.M., Kroll J. (*2002*).** Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3566-3571.

- **Rico M., Bruix M., González C., Monsalve R.I., Rodríguez R. (*1996*).** 1H NMR assignment and global fold of napin BnIb, a representative 2S albumin seed protein. *Biochem.*, 35, 15672-15682.

- **Rouessac F., Rouessac A. (*1996*).** Electrophorèse capillaire. Edition Masson. Analyse chimique. *Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 101-110.

- **Rozan P., Villaume C., Bau H.M., Schwertz A., Nicolas J.P., Mejean I. (*1996*).** Detoxification of rapeseed meal by *Rhizopus oligosporus* sp.T3: a first step towards rapeseed protein concentrate. *Ind. J. Food Sci. Technol.*, 31, 1, 85-90.

- **Rozan P. (*1997*).** Traitements technologiques et prise alimentaire (exemple du tourteau de colza industriel). Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I.

- **Rozan P., Lamghari R., Linder M., Villaume C., Fanni J., Parmentier M., Méjean L. (*1997*).** In vivo and in vitro digestibilité of soybean, lupine, and rapeseed meal proteins after various technological processes. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1762-1769.

- **Rubino M.I., Arntfield S.D., Nadon C.A., Bernatsky A. (*1996*).** Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein. *Food Research Int.*, 29, 7, 653-659.

- **Sadana A. (*1986*).** Biocatalysis. Fundamentals of enzyme deactivation kinetics.

- **Saha B.C., K. Hayashi K. (*2001*).** Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnol. Adv.*, 19, 255-370.

- **Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. (*2003*).** Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 571-581.

- **Sánchez A.C., Burgos J. (*1996*).** Thermal gelation of trypsin hydrolysates of sunflower proteins: effect of pH, protein concentration, and hydrolysis degree. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3773-3777.

- **Savoie L., Parent G., Galibois I. (*1991*).** Effects of alkali treatment on the in-vitro digestibility of proteins and the release of amino acids. *J. Sci. Food Agric.*, 56, 363-372.

- **Schlaeger E.-J. (*1996*).** The protein hydrolysate, Primatone RL, is a cost-effective multiple growth promoter of mammalian cell culture in serum-containing and serum-free media and displays anti-apoptosis properties. *J. Immunological Methods*, 194, 191-199.

- **Schmidt I., Renard D., Rondeau D., Richomme P., Popineau Y., Axelos M. A.-V. (*2004*).** Detailed physicochemical characterization of the 2S storage protein from rape (*Brassica napus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5995-6001.

- **Schweizer M. (*2002*).** Fractionnement et identification de petits peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines de colza. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.

- **Schwenke K.D., Schultz M., Linow K.J., Gast K., Zirwer J. (*1980*).** Hydrodynamic and quasi elastic scattering studies on the 12S globulin from rapeseed. *Inn. J. Pept. Prot. Res.*, 16, 12-18.

- **Schwenke K.D., Raab B., Linow K.-J., Pähtz W., Uhlig J. (*1981*).** Isolation of the 12S globulin from rapeseed (*Brassica napus* L.) and characterization as a “neutral” protein. *Die Narrung*, 25, 3, 271-280.

- **Schwenke K.D., Drescher B., Zirwer D., Raab B. (*1988*).** Structural studies on the native and chemically modified low-molecular mass basic storage protein (napin) from rapeseed (*Brassica napus L.*). *Biochem. Physio. Pflanzen*, 183, 219-224.

- **Schwenke K.D., Mothes R., Gast K., Zirwer D. (*1989*).** Rapeseed protein polyanion interactions. Proceedings of the 3rd symposium on food proteins. *Abhandlungen der Akademieder Wissenchaften der DDR.*, 1, 105-113.

- **Schwenke K.D. (*1990*).** Structural studies on native and chemical modified storage proteins from rapeseed (*Brassica napus L.*) and related plant proteins. *Nahrung*, 34, 3, 225-240.

- **Schwenke K.D. (*1994*).** Rapeseed proteins. New and developing sources of food proteins. Edited by B.J.F. Hudson. Published by Chapman and Hall., 281-306.

- **Schwenke K.D., Dahme A., Wolter T. (*1998*).** Heat-induced gelation of rapeseed proteins: effect of protein interaction and acetylation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 1, 83-87.

- **Schwenke K.D., Mothes R., Dudek S., Gömitz E. (*2000*).** Phosphorylation of the 12S globulin from rapeseed (Brassica napus L.) by phosphorylation oxychloride: chemical and conformational aspects. *J. Agric. Chem.*, 48, 708-715.

- **Serraino M.R., Thompson L.U. (*1984*).** Removal of phytic acid and protein-phytic acid interactions in rapeseed. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 38-40.

- **Shah B., Kumar S.R., Devi S. (*1995*).** Immobilized proteolytic enzymes on resinous materials and their use in milk-clotting. *Process Biochem.*, 30, 63-68.

- **Shahidi F., Gabon J.E., Rubin L.J., Naczk M. (*1990*).** Effect of methanol-ammonia-water treatment on the fate of glucosinolates. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 251-255.

- **Shahidi F., Naczk M. (*1992*).** An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 917-924.

- **Shi D., He Z., Qi W. (*2004*).** Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochem.*, 40, 5, 1943-1949.

- **Shires A., Bell J.M., Blair R., Blake J.A., Fedec P., Mc Gregor D.I. (*1981*).** Nutritional value of unextracted and extracted dehulled Canola rapeseed for broiler chickens. *Can. J. Ani. Sci.*, 61, 989-998.

- **Silva S.V., Malcata F.X. (*2004*).** Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.*, 15, 1, 1-15.

- **Silvestre M.P.C. (*1997*).** Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.*, 60, 2, 263-271.

- **Simbaya J., Slominski B.A., Guenter W., Morgan A., Campbell L.D. (*1996*).** The effects of protease and carbohydrase supplementation on the nutritive value of canola meal poultry : in vitro and in vivo studies. *An Feed Sci. Technol.*, 61, 219-234.

- **Simard C., Dupont Y., Boulet M. (*1977*).** Propriétés physicochimiques et composition en acides aminés des fractions de protéines de soja, de fèverole, de colza et de feuille de luzerne. *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, 10, 326-330.

- **Simpson B.K., Nayeri G., Vaylayan V., Ashie I.N.A. (*1998*).** Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chem.*, 61, 1/2, 131-138.

- **Smyth M., FitzGerald R.J. (*1997*).** Characterisation of a new chromatography matrix for peptide molecular mass determination. *Int Dairy J.*, 7, 571-577.

- **Smyth M., FitzGerald R.J. (*1998*).** Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *Int. Dairy J.*, 8, 819-827.

- **Sosulski F.W. (*1979*).** Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 711-714.

- **Sosulski F.W. (*1983*).** Developments in Food Proteins – 2. Ed B.J.F. Hudson, Applied Science Publishers, London and New York.

- **Sosulski F.W., Dabrowski K.J. (*1984*).** Determination of glucosinolates in canola meal and protein products by desulfation and capillary gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1172-1175.

- **Sousa R. Jr, Lopes G.P., Tardioli P.W., Giordano R.L.C., Almeida P.I.F., Giordano R.C. (*2004*).** Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gels particles. *Brazilian J. Chem. Eng.*, 21, 2, 147-153.

- **Spellman D., McEvoy E., O'Cuinn G., FitzGerald R.J. (*2003*).** Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparaison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int. Dairy J.*, 13, 447-453.

- **Steinhardt H., Beychok S. (*1964*).** Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules. Dans : The Protein, vol. 2. Editeur : Neurath H.; New York : Academic Press, 139-304.

- **Stoner M.R., Dale D.A., Gualfetti P.J., Becker T., Manning M.C., Carpenter J.F., Randolph T.W. (*2004*).** Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizers and protease inhibitors. *Enz. Microbial Technol.*, 34, 114-125.

- **Strömqvist M. (*1994*).** Peptide mapping using combinations of size-exclusion chromatography, reversed-phase chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 667, 304-310.

- **Tardioli P.W., Pedroche J., Giordano R.L.C., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. (*2003*).** Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-Glyoxyl agarose. *Biotechnol. Prog.*, 19, 352-360.

- **Tessier M., Viollet B., Egly J.M. (*1992*).** La précipitation des protéines. *Le technoscope de biofutur*, 54, 3-14.

- **Tessier B. (*2004*).** Fractionnement par un procédé membranaire de petits peptides issus du tourteau de colza : caractérisation de propriétés biologiques et développement d'une méthode d'identification. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.

- **Tessier B., Blanchard F., Vanderesse R., Harscoat C., Marc I. (*2004*).** Applicability of predictive models to the peptide mobility analysis by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1024, 255-266.

- **Thompson L.U., Reyes E., Jones J.D. (*1982a*).** Modification of the sodium hexametaphosphate extraction – precipitation technique of rapeseed protein concentrate preparation. *J. Food Sci.*, 47, 982-988.

- **Thompson L.U., Liu R.F.K., Jones J.D. (*1982b*).** Functional properties and food applications of rapeseed protein concentrate. *J. Food Sci.*, 47, 1175-1180.

- **Thompson L.U., Serraino M. (*1986*).** Effect of phytic acid reduction on rapeseed protein digestibility and amino acid absorption. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 468-469.

- **Tossavainen O., Syväoja E.-L., Tuominen J., Heinänen M., Kalkkinen N. (*1997*).** Determination of the peptide size range of an extensively hydrolysed protein hydrolysate. *Milchwissenschaft*, 52, 2, 63-67.

- **Tossi A., Tarantino C., Mitaritonna N., Rocco G., Romeo D. (*1997*).** Design of antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. In Peptides – Frontiers of peptide Science, Prooceedings of the 15th America Peptide Symposium, Nashville, Tennessee, U.S.A., Ed. J.P. Tam and P.T.P. Kaumaya.

- **Trivin F., Le Bricon T. (*2003*).** Nouvelles techniques d'électrophorèse : applications aux protéines et à l'ADN. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 18, 11-22.

- **Tzeng Y.M., Diosady L.L., Rubin L.J. (*1988*).** Preparation of rapeseed protein protein isolate by sodium hexametaphosphate extraction, ultrafiltration, diafiltration, and ion-exchange. *J. Food Sci.*, 53, 5, 1537-1541.

- **Tzeng Y.M., Diosady L.L., Rubin L.J. (*1990*).** Production of canola protein materials by alkaline extraction, precipitation and membrane processing. *J. Food Sci.*, 55, 4, 1147-1156.

- **Van der Plancken I., Van Remoortere M., Indrawati, Van Loey A., Hendrickx M.E. (*2003*).** Heat-induced changes in the susceptibility of egg white proteins to enzymatic hydrolysis: a kinetic study. *J. Agric. Chem.*, 51, 3819-3823.

- **Van der Ven C., Gruppen H., de Bont D.B.A., Voragen A.G.J. (*2001*).** Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates: relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution. *Int. Dairy J.*, 11, 83-92.

- **Van Megen Wilhelmus H. (*1981*).** Process for producing a detoxified rapeseed protein concentrate. US4244973.

- **Vig A.P., Walia A. (*2001*).** Beneficial effects of *Rhizopus oligosporus* fermentation on reduction of glucosinolates, fibre and acid phytic in rapeseed (*Brassica napus*) meal. *Biores. Technol.*, 78, 309-312.

- **Villanueva A., Vioque J., Sanchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Bautista J., Millan F. (*1999*).** Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 1455-1460.

- **Vioque J., Sánchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Bautista J., Millan F. (*1999*).** Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 7, 819-823.

- **Vioque J., Sánchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Millán F. (*2000*).** Partially hydrolysed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 447-450.

- **Vioque J., Sánchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Mar Yust M., Millán F. (*2001*).** Alcalase rapeseed inhibitors: purification and partial characterization. *J. Enz. Inhibition*, 16, 81-87.

- **Vorob'ev M.M., Paskonova E.A., Vitt S.V., Belikov V.M. (*1986*).** Kinetic description of proteolysis. Part 2. Substrate regulation of peptide bond demasking and hydrolysis. Liquid chromatography of hydrolyzate. *Die Nahrung*, 30, 10, 995-1001.

- **Vorob'ev M.M., Vitt S.V., Belikov V.M. (*1987a*).** Kinetic description of proteolysis. Part 3. Total kinetics of peptide bonds hydrolysis in peptide mixtures. *Die Nahrung*, 31, 4, 331-340.

- **Vorob'ev M.M., SlobodyanikovaL.S., Vitt S.V., Latov V.K., Belikov V.M. (*1987b*).** Kinetic description of proteolysis. Part 4. Hydrolysis kinetics of partial protein hydrolysates. *Die Nahrung*, 31, 8, 777-782.

- **Vorob'ev M.M., Parent G., Savoie L. (*1996*).** Quantitative comparison of casein and rapeseed proteolysis by pancreatin. *Nahrung*, 40, 5, S.248-255.

- **Wanasundara U., Amarowicz R., Shahidi F. (*1994*).** Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1285-1290.

- **Wheeler E.L., Ferrel R.E. (*1971*).** A method of phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem.*, 48, 312-320.

- **Wu J., Ding X. (*2002*).** Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research Int.*, 35, 367-375.

- **Xu L., Diosady L.L. (*1994*).** The production of chinese rapeseed protein isolates by membrane processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 9, 935-939.

- **Xu L., Diosady L.L. (*1997*).** Rapid method for total phenolic acid determination in rapeseed/canola meals. *Food Research Int.*, 30, 8, 571-574.

- **Xu L., Diosady L.L. (*2000*).** Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media. *Food Research Int.*, 33, 725-731.

- **Xu L., Diosady L.L. (*2002*).** Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. *Food Research Int.*, 35, 23-30.

- **Yang Z.-H., Xiu J.-H., Zhu Y.-M., X.-K. Shi (*1988*).** Determination of glucosinolate in rapeseed meal by infrared spectrometry. *Analyst*, 113, 355-357.

- **Yang Z., Domach M., Auger R., Xiao Yang F., Russell A.J. (*1996*).** Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enz. Microb. Technol.*, 18, 82-89.

- **Yeboah F.K., Alli I., Simpson B.K., Konishi Y., Gibbs B.F. (*1999*).** Tryptic fragments of phaseolin from protein isolates of *Phaseolus* beans. *Food Chem.*, 67, 105-112.

- **Yoshida N., Tsuruyama S., Nagata K., Hirayama K., Noda K., Makisumi S. (*1988*).** Purification and characterization of an acidic amino acid specific endopeptidase of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation (Pronase). *J. Biochem.*, 104, 451-456.

- **Zhao Q., Piot J.M., Sannier F., Guillochon D. (*1995*).** Peptic hemoglobin hydrolysis in an ultrafiltration reactor at pilot plant scale generates opioid peptides. *Ann N. Y. Acad Sci.*, 750, 452-458.

- **Zhao Q., Le Coeur C., Piot J.M. (*1997*).** Analysis of peptides from bovine hemoglobin and tuna myoglobin enzymatic hydrolysate: use of HPLC with on-line second-order derivative spectroscopy for the characterization of biologically active peptides. *Analytica Chimica Acta*, 352, 201-220.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Pascal DHULSTER, Professeur, LTSN, Université de Lille, Villeneuve d'Ascq

Monsieur Frédéric SANNIER, Professeur, LBCB, Université de La Rochelle, La Rochelle

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur CHABANON Gérald

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

""Hydrolyses enzymatiques d'isolats protéiques issus de tourteaux de colza : cinétique, modélisation, caractérisation et fonctionnalité des peptides"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Procédés biotechnologiques et alimentaires »**

Fait à Vandoeuvre, le 04 octobre 2005
Le Président de l'I.N.P.L.,
L. SCHUFFENECKER

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Résumé

Cette thèse a permis d'étudier l'obtention de peptides biologiquement actifs ou à propriétés fonctionnelles à travers la mise en œuvre et le développement de procédés de préparation et d'hydrolyse d'isolats de protéines issus de tourteaux de colza.
Tout d'abord, un procédé de préparation de deux isolats protéiques se différenciant par le type de protéines les constituant (Globuline ou Albumine) a été développé. Les deux isolats ne possèdent pas de bonnes propriétés fonctionnelles mais leur hydrolyse partielle par l'Alcalase 2,4L permet d'en améliorer certaines.
Puis, l'action hydrolytique de protéases commerciales (Alcalase 2,4L, Pronase SG, Neutrase 0,8L, Prolyve BS, Lypaïne 6500, Orientase 90N, Espérase 7,5L) sur l'isolat de globulines a été comparée. La valorisation des hydrolysats a porté sur leur capacité à favoriser la croissance de cellules animales cultivées dans un milieu sans sérum de veau fœtal. Il a été montré que les cinétiques d'hydrolyse, la taille des peptides produits et l'activité biologique des hydrolysats sont significativement influencées par la spécificité de l'enzyme et qu'il existe une relation enzyme / degré d'hydrolyse (DH) / activité ciblée.
Enfin, nous avons montré pour trois systèmes enzyme/substrat différents (Alcalase/Globuline, Pronase/Globuline et Alcalase/Albumine) qu'à un DH et à un pH donnés, la composition peptidique des hydrolysats est indépendante des concentrations initiales en enzyme et en substrat et de la température. Ainsi, la prédiction de l'évolution temporelle du DH, quelles que soient les valeurs de ces paramètres, permet de contrôler la génération d'un mélange peptidique aux propriétés ciblées. Un modèle phénoménologique basé sur le schéma réactionnel de Michaelis-Menten a alors été construit afin de simuler les cinétiques d'hydrolyse en réacteur discontinu. Pour cela, les phénomènes limitants impliqués dans l'hydrolyse (inhibition ou inactivation de l'enzyme, modification du substrat) ont été mis en évidence.

Mots-clés : tourteau de colza, protéase, peptide, isolat, degré d'hydrolyse, modélisation, propriétés fonctionnelles, cellules animales, activité biologique, chromatographie, pH-Stat, Michaelis-Menten.

Abstract

This thesis made it possible to study obtaining biologically active peptides or with functional properties through the development of processes for the preparation and the hydrolysis of protein isolates resulting from rapeseed cakes.
First, a method of preparation of two protein isolates being different by the type of proteins (Globulin or Albumin) was developed. The two isolates do not have good functional properties but their partial hydrolysis by Alcalase 2.4L improves some of them.
Then, the hydrolytic action of commercial proteases (Alcalase 2.4L, Pronase SG, Neutrase 0.8L, Prolyve BS, Lypaïne 6500, Orientase 90N, Espérase 7.5L) on the isolate of globulins was compared. The valorisation of the hydrolysates related to their capacity to promote the growth of animal cells cultivated in a serum-free medium. It was shown that the kinetics of hydrolysis, the size of produced peptides and the biological activity of the hydrolysates are significantly influenced by the specificity of the enzyme and there is a relation enzyme/ degree of hydrolysis (DH)/ targeted activity.
Lastly, we showed for three different enzyme/substrate systems (Alcalase / Globulin, Pronase / Globulin and Alcalase / Albumin) that at given DH and pH, the peptide composition of the hydrolysates is independent of the initial enzyme and substrate concentrations and of the temperature. Thus, the prediction of the temporal evolution of the DH, whatever the values of precedent parameters, allows to control the generation of a peptide mixture with targeted properties. A model based on the reaction pathway of Michaelis-Menten was then built in order to simulate the hydrolysis kinetics in batch reactor. For that, limiting phenomena implied in the hydrolysis (inhibition or inactivation of the enzyme, modification of the substrate) were highlighted.

Key words: oil cake of colza, protease, peptide, isolate, degree of hydrolysis, model, functional properties, animal cells, biological activity, chromatography, pH-Stat, Michaelis-Menten.