

MARTIN ROLLAND

**Mise au point d'un hydrolysate enzymatique de protéines de lactosérum
pour la fortification protéique d'un jus d'orange**

**Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

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

JUILLET 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-44951-3

Canada

RÉSUMÉ

Ajoutées à forte concentration dans les jus de fruits, les protéines de lactosérum précipitent suite au traitement de pasteurisation appliqué à ce type de produit. L'objectif de ce travail était donc d'améliorer la solubilité des protéines de lactosérum par l'hydrolyse enzymatique de manière à permettre la fortification protéique d'un jus d'orange avec ces protéines et ce, en vue de la fabrication d'une boisson nutraceutique riche en peptides d'une taille (<5000 Da) facilitant leur absorption par l'organisme. Il a été démontré que l'hydrolyse d'un isolat de protéines de lactosérum à l'aide des enzymes alcalase et enzeco[®] bacterial protease II permet d'obtenir des ingrédients protéiques hydrolysés dont les caractéristiques de solubilité et de valeur nutritionnelle sont bien adaptées à la fortification protéique d'un jus d'orange. En effet, ces ingrédients contiennent une teneur élevée en protéines (>87%) de bonne qualité nutritive (CEP 3.2-3.6), une faible teneur (<1%) en lactose et en matière grasse et un contenu acceptable en sodium (~7mg/g). Les deux hydrolysats protéiques sont également riches en peptides de poids moléculaire inférieur à 5000 Da, lesquels sont reconnus pour leur absorption rapide par l'organisme; la teneur en ces peptides est de 65 et 94% pour les hydrolysats obtenus à l'aide de l'enzeco[®] bacterial protease II et l'alcalase, respectivement. Enfin, le plus grand avantage de l'hydrolyse enzymatique des protéines de lactosérum réside dans l'amélioration de la solubilité de ces protéines dans le jus d'orange suite à l'application d'un traitement thermique sévère (100°C, 7 minutes). En effet, il a été démontré qu'à la suite de ce traitement thermique, la solubilité de l'isolat de protéines de lactosérum additionné à un jus d'orange selon une cote protéique de 20, est de 34%, alors que celle des deux hydrolysats enzymatiques, dans les mêmes conditions, est supérieure à 70%.

AVANT-PROPOS

Je voudrais remercier sincèrement ma directrice de recherche, Mme Sylvie Gauthier et mon co-directeur M. Yves Pouliot, pour leur soutien financier, technique et émotionnel. Vos précieux conseils et votre bonne humeur m'ont permis de franchir une étape importante de ma vie.

J'aimerais aussi remercier Sophie Myrand, Guillaume Brisson et Pierre-Louis Leclerc qui ont tous les trois contribué aux expériences en laboratoire.

Je remercie spécialement ma famille pour les constants encouragements ainsi qu'Anick pour sa patience et sa compréhension. Je souhaite également saluer et remercier mes amis les plus proches lors de mon passage à Québec pour leur présence, leurs conseils et leurs sourires quotidiens : Maurice de Wit, Arnaud Picot, Aldo Schepers et Claudine Thiers. Sans vous, mes études de deuxième cycle n'auraient pas été les mêmes !

Je tiens aussi à remercier NOVALAIT, le FCAR ainsi que le CQVB, qui ont fourni les fonds nécessaires à la réalisation de ce projet de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

	page
RÉSUMÉ	II
AVANT-PROPOS	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	VII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
1.1 Les nutraceutiques	5
1.2 Les boissons à base de lactosérum	9
1.3 Les ingrédients à base de lactosérum	13
1.4 Les protéines de lactosérum	17
1.4.1 La β -lactoglobuline	17
1.4.2 L' α -lactalbumine	19
1.4.3 Les propriétés fonctionnelles des protéines de lactosérum	19
1.4.4 La stabilité thermique des protéines de lactosérum	22
1.4.5 La valeur nutritionnelle et les vertus thérapeutiques des protéines de lactosérum	24
1.5 Les hydrolysats enzymatiques de protéines	26
1.5.1 Procédés de fabrication des hydrolysats protéiques	27
1.5.2 Les protéases	29
1.5.3 Les conditions d'hydrolyse	30
1.5.4 Les méthodes de contrôle de la réaction d'hydrolyse	31
1.5.5 Les traitements de désactivation et/ou d'élimination de l'enzyme en fin de réaction	33
1.5.6 Les méthodes d'évaluation de la qualité des hydrolysats protéiques	34
1.5.7 Effet de l'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines	34

1.6 But, hypothèse et objectifs	35
CHAPITRE 2 : MISE AU POINT D'UN HYDROLYSAT ENZYMATIQUE DE PROTÉINES DE LACTOSÉRUM POUR LA FORTIFICATION PROTÉIQUE D'UN JUS D'ORANGE	38
2.1 Résumé	39
2.2 Introduction	40
2.3 Matériel et méthode	42
2.3.1 Matériel	42
2.3.2 Dosage de l'activité enzymatique spécifique des enzymes	42
2.3.3 Mise au point des conditions d'hydrolyse enzymatique	43
2.3.4 Préparation finale des hydrolysats enzymatiques	47
2.3.5 Évaluation des caractéristiques physico-chimiques des ingrédients protéiques	48
2.3.6 Méthodes analytiques	50
2.4 Résultats et discussion	54
CONCLUSION GÉNÉRALE	81
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	85

LISTE DES FIGURES

	page
CHAPITRE 1	
Figure 1.1 : Représentation schématique des procédés utilisés en industries pour la concentration des protéines de lactosérum.	14
Figure 1.2 : Représentation schématique des changements structuraux de la β -lactoglobuline en fonction du pH.	18
Figure 1.3 Procédé de fabrication d'un hydrolysats protéique.	28
CHAPITRE 2	
Figure 2.1 : Cinétique d'hydrolyse du Bipro [®] obtenue à l'aide de l'alcalase, de la chymotrypsine et de l'enzeco [®] bacterial protease II.	69
Figure 2.2 : Effet du pH et de la présence de calcium sur la cinétique d'hydrolyse du Bipro [®] obtenue à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II.	70
Figure 2.3 : Cinétique d'hydrolyse du Bipro [®] obtenue à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II, mesurée par la méthode pH-Stat et par une combinaison des méthodes pH-Stat et osmométrie.	71
Figure 2.4 : Comparaison des jus d'orange additionnés (cote protéique de 20) de Bipro [®] et des hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II.	72

LISTE DES TABLEAUX

	page
CHAPITRE 1	
Tableau 1.1 : Exemples de produits nutraceutiques trouvés sur le marché japonais et européen.	7
Tableau 1.2 : Boissons à base de lactosérum trouvées sur le marché européen.	12
Tableau 1.3 : Composition (%) de différents ingrédients à base de lactosérum utilisés dans la fabrication des boissons.	16
CHAPITRE 2	
Tableau 2.1 : Comparaison du profil (%) de poids moléculaire des composantes protéiques du Bipro [®] et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'alcalase, de la chymotrypsine et de l'enzeco [®] bacterial protease II.	73
Tableau 2.2 : Effet du contrôle du pH en cours d'hydrolyse sur la composition minérale, le ratio AN/TN et le profil de poids moléculaire des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II.	74
Tableau 2.3 : Effet des conditions (T°, durée) du traitement thermique de désactivation de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II sur le ratio AN/TN (%) mesuré après la désactivation de l'enzyme et après une durée additionnelle d'agitation de 60 minutes à 45°C.	75
Tableau 2.4 : Caractéristiques physico-chimiques du Bipro [®] et des hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II.	76
Tableau 2.5 : Indice (%) de solubilité de l'azote (NSI) du Bipro [®] et des hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II, mesuré en solution aqueuse (NSI standard), dans une solution modèle (NSI modifié) et dans un jus d'orange (NSI modifié).	77

Tableau 2.6 : Turbidité (D.O. _{610 nm}) de la solution modèle, additionnée selon quatre cotes protéiques avec le Bipro [®] et les hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II	78
Tableau 2.7 : Viscosité (cp) de la solution modèle et du jus d'orange, additionnés selon quatre cotes protéiques avec le Bipro [®] et les hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II.	79
Tableau 2.8 : Indice (%) de solubilité de l'azote (NSI) suivant le traitement thermique (100°C, 7 min.) de la solution modèle et du jus d'orange, additionnés selon quatre cotes protéiques avec le Bipro [®] et les hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco [®] bacterial protease II.	80

INTRODUCTION

Ces dernières années, les produits allégés (faible ou sans gras, cholestérol, sucre, calorie) ont connu un franc succès auprès des consommateurs alors qu'aujourd'hui, leur popularité diminue pour laisser la place aux aliments dits «fonctionnels» ou «nutraceutiques». Les nutraceutiques sont des aliments ou des ingrédients qui offrent des vertus thérapeutiques et des bénéfices pour la santé des individus. Ces produits présentent l'image d'une vie meilleure et suscitent donc un intérêt marqué chez les consommateurs (Hilliam, 1995; Le Toullec, 1995; Paquin et Gauthier, 1995; Pitts, 1995; Ohr, 1997). Actuellement, le marché des nutraceutiques est en pleine croissance et d'ici quinze ans, on prévoit qu'il pourrait atteindre 500 milliards de dollars US (Paquin et Gauthier, 1995).

Le Japon a été le premier pays à encourager la commercialisation des produits nutraceutiques. En 1991, il a mis sur pied une réglementation qui permet aux entreprises la vente de produits offrant des vertus médicinales. Depuis, l'Europe et les États-Unis ont assoupli leur réglementation afin de permettre, eux aussi, l'affichage de certaines d'allégations «santé» sur les étiquettes alimentaires (Potter, 1990; Paquin et Gauthier, 1995; Potter, 1995; Roberfroid, 1998). Dans le cas du Canada, la législation est plus sévère et ne permet pas l'affichage de ce type d'allégation. En fait, la réglementation canadienne exige que les produits faisant la mention d'actions thérapeutiques ou pharmacologiques soient classés dans la catégorie des médicaments et des drogues. Ces contraintes limitent donc, pour le moment, la commercialisation des produits nutraceutiques au Canada (Paquin et Gauthier, 1995). Malgré ces limitations, les compagnies alimentaires et pharmaceutiques investissent des efforts considérables dans le développement des nutraceutiques afin de prendre leur part de ce marché.

Actuellement, l'aliment nutraceutique le plus populaire auprès des consommateurs est la boisson non alcoolisée qui représente plus de 50% du marché japonais (Paquin et Gauthier, 1995). Dans ces boissons, une gamme variée de composantes nutraceutiques sont ajoutées telles des minéraux, des vitamines, des protéines, des fibres, etc. (Sfiligoj, 1994; Paquin et

Gauthier, 1995; Toursel, 1998). De façon générale, la boisson est le véhicule alimentaire idéal pour l'ajout de composantes nutraceutiques. En effet, la boisson est populaire auprès des consommateurs car elle s'ajoute facilement au régime alimentaire et ne requiert aucune préparation.

Pour l'industrie laitière, la fortification protéique de boissons non alcoolisées peut s'avérer intéressante pour la valorisation du lactosérum de fromagerie. En effet, le lactosérum est riche en minéraux et protéines de bonne qualité et la présence de ces éléments dans le lactosérum en font un ingrédient hautement nutritif. En plus d'être facilement digestibles, les protéines de lactosérum sont une excellente source d'acides aminés essentiels (Ziajka et al., 1994; Blomsma, 1997).

À ce jour, deux types de boisson à base de lactosérum ont été fabriqués: les boissons à base d'alcool (bière ou vin) et les boissons sans alcool (gazeuse ou non). En outre, certaines études ont démontré que le consommateur accepte les caractéristiques organoleptiques des jus d'agrumes additionnés de lactosérum ou de ses protéines (Sienkiewicz et Riedel, 1990). Dans ces jus, le lactosérum est facile à mélanger et sa saveur de "petit lait" est bien masquée. Ces boissons désaltérantes et nutritives répondent spécifiquement aux besoins des sportifs, des personnes âgées ou des individus sous régime amaigrissant (Tuohy et al., 1988; Gandhi, 1989; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Vojnovic et al., 1993; Frøkjær, 1994; Swartz, 1995). Toutefois, la teneur en protéines de lactosérum de ces boissons dépasse rarement 3%, en raison de leur faible solubilité à pH acide et de leur instabilité lors du traitement de pasteurisation de ces boissons.

Pour augmenter la teneur en protéines de lactosérum des boissons et résoudre leur problème de solubilité et d'instabilité thermique, il est possible d'hydrolyser ces protéines par voie enzymatique. De façon générale, l'hydrolyse enzymatique des protéines permet de modifier leur propriétés fonctionnelles, dont leur solubilité, mais elle permet aussi d'améliorer leur digestibilité. Cette méthode offre également la possibilité de contrôler le degré d'hydrolyse des protéines et ainsi, d'obtenir une gamme de peptides dont la taille favorise leur absorption intestinale (Blenford, 1994; Frøkjær, 1994; Ziajka et al., 1994; Panyam et Kilara, 1996). Par

contre, l'apparition d'amertume dans les hydrolysats protéiques est une limite à leur utilisation dans les boissons, mais ce problème peut être réduit par un ajustement des conditions d'hydrolyse (degré d'hydrolyse, nature de l'enzyme et du substrat, etc.) ou par l'utilisation d'exopeptidases spécifiques à l'hydrolyse des peptides amers (Blenford, 1994; Frøkjær, 1994; Gonzalez-Tello et al., 1994; Mahmoud, 1994; Pedersen, 1994; Panyam et Kilara, 1996).

Le but de la présente étude visait donc la mise au point d'un hydrolysats enzymatique de protéines de lactosérum pour la fortification protéique d'un jus d'orange et ce, en vue de la préparation d'une boisson nutraceutique. Pour ce type d'application, l'hydrolysats enzymatique devait donc répondre à certaines exigences en terme de solubilité et de turbidité à pH acide, de stabilité lors de traitements thermiques, mais également en terme de réduction de la taille des molécules protéiques afin de faciliter leur absorption par l'organisme. L'ensemble du travail a donc été défini de manière à rencontrer ces exigences, mais également dans un souci de mise à l'échelle industrielle du procédé de fabrication de l'hydrolysats enzymatique.

La prochaine section de la thèse (chapitre 1) est une revue de la littérature qui présente la situation actuelle des nutraceutiques et des boissons à base de lactosérum, et qui résume les principales caractéristiques des ingrédients à base de protéines de lactosérum. Une partie de la revue de la littérature est également consacrée à la description de l'hydrolyse des protéines par voie enzymatique et son impact sur les propriétés des protéines de lactosérum. Cette section se termine enfin par la présentation de l'hypothèse, du but et des objectifs à la base de ce travail de recherche. À noter que les références citées dans la revue de littérature sont regroupées à la toute fin de la thèse, dans la section «Références bibliographiques».

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 LES NUTRACEUTIQUES

Le premier rôle de notre alimentation est de fournir à l'organisme les nutriments nécessaires pour combler ses besoins métaboliques. Toutefois, des études récentes ont démontré qu'au-delà de la nutrition, le régime alimentaire d'un individu pouvait moduler une variété de fonctions biologiques et ainsi, avoir un impact sur sa santé (Lillford, 1995; Pitts, 1995; Roberfroid, 1998). Ces études sont donc à la base d'un tout nouveau concept en alimentation, celui des aliments dits «fonctionnels» ou des «nutraceutiques» (Anonyme, 1993; Childs, 1995; Le Toullec, 1995; Lillford, 1995; Potter, 1995; Wasik, 1995; Grijspaardt-Vink, 1996; Roberfroid, 1998).

Contrairement aux produits allégés, dont la teneur en composantes jugées nuisibles pour la santé a été réduite, les aliments fonctionnels ont quelque avantage à offrir aux consommateurs (Potter, 1990; Hilliam, 1995; Le Toullec, 1995; Morel, 1995; Paquin et Gauthier, 1995; Pitts, 1995; Potter, 1995; Martin, 1996; Ohr, 1997). En fait, les nutraceutiques sont des aliments ou des ingrédients qui offrent des vertus thérapeutiques et des bénéfices pour la santé. Ces produits présentent l'image d'une vie meilleure et suscitent donc un intérêt marqué chez les consommateurs. Actuellement, le marché des nutraceutiques est en pleine croissance et d'ici l'an 2010, on prévoit qu'il pourrait atteindre 500 milliards de dollars US (Paquin et Gauthier, 1995). Afin de s'accaparer d'une part de ce marché, les entreprises alimentaires et pharmaceutiques investissent donc des efforts considérables dans la mise au point de ce type de produits (Pszczola, 1992; Anonyme, 1993; Hunt, 1994; DeFelice, 1995; Giese, 1995; Hilliam, 1995; Hollingsworth, 1995; Lillford, 1995; Paquin et Gauthier, 1995; Wasik, 1995; Klont et Mannion, 1996; Martin, 1996; Ohr, 1997; Bussien, 1998; Roberfroid, 1998).

Les Japonais ont été les pionniers dans la mise en marché de produits nutraceutiques. En raison du vieillissement de la population et des coûts reliés aux soins de santé, le gouvernement japonais a mis sur pied, dans les années 1980, différents comités en vue d'établir les limites des allégations «santé» et ainsi, encourager le développement de produits offrant des vertus médicinales. C'est ainsi qu'en juillet 1991, la réglementation «FOSHU»

(*Food for Specific Health Use*) était adoptée. Depuis le premier produit accepté par la nouvelle loi, en 1993, plusieurs produits nutraceutiques ont été commercialisés et comme exemple, citons le lait fermenté *Yakult* dont les allégations «santé» sont la prévention du vieillissement et le maintien de l'élasticité de la peau (Potter, 1990; Hunt, 1994; Lemoine et Dunn, 1994; Hollingsworth, 1995; Paquin et Gauthier, 1995; Pitts, 1995; Potter, 1995; Roberfroid, 1998). Des exemples de produits nutraceutiques trouvés au Japon et dans certains pays d'Europe sont présentés au tableau 1.1.

Aux États-Unis, certaines allégations «santé» sont également autorisées depuis l'entrée en vigueur du *Nutrition Labelling and Education Act* (NLEA) en 1990, et du *Dietary Supplement Act* en 1994. En l'hiver 1996, la *Food and Drug Administration* (FDA) avait approuvé 10 allégations «santé» mettant en relation des composantes alimentaires et leurs effets sur certains types de maladies. Dans ce pays, il est actuellement possible d'établir un lien 1) entre les fibres alimentaires et la réduction des risques de certains cancers; 2) entre les fibres alimentaires et la réduction des risques de maladies cardiaques; 3) entre les lipides et l'augmentation des risques de certains cancers; 4) entre les lipides et les risques de maladies cardiaques; 5) entre le calcium et son effet positif sur l'ostéoporose; 6) entre le sodium et les risques d'hypertension; 7) entre la consommation de certains sucres et la carie dentaire; 8) entre l'acide folique et les défauts du tube neural chez les nouveau-nés; 9) entre la consommation de fruits et de légumes et la réduction des risques de cancers; 10) entre l'avoine et la réduction des risques de maladies cardiaques (Pszczola, 1992; Paquin et Gauthier, 1995; Best, 1996b; Martin, 1996; Houlton, 1997; Ohr, 1998; Roberfroid, 1998).

Dans le but d'encourager les investissements privés en recherche dans le secteur des nutraceutiques, plusieurs spécialistes aux États-Unis revendiquent maintenant l'amendement d'une nouvelle clause, permettant à une industrie de breveter une allégation «santé» et/ou un produit ou encore, l'exclusivité de fabrication pendant un certain nombre d'années comme il est possible de le faire dans le domaine pharmaceutique (Pszczola, 1992; Hunt, 1994; DeFelice, 1995; Kevin, 1995; Best, 1996b; Klont et Mannion, 1996; Martin, 1996; Giese et Katz, 1997; Klont et Mannion, 1998).

Tableau 1.1: Exemples de produits nutraceutiques trouvés sur le marché japonais et européen¹.

Produits	Fabricants	Caractéristiques
FibeMini	Otsuka Pharmaceuticals	Boisson enrichie en fibres, minéraux et vitamines.
FP21	Asahi Beer Co.	Boisson riche en protéines (collagène).
Fibi	Coca-Cola	Boisson riche en fibres.
CaD	Asahi Breweries Ltd.	Boisson fortifiée en calcium.
Yakult	Yakult	Breuvage laitier fermenté.
Pocari sweet Stevia	Ootsuka	Boisson isotonique à base de stevioside, un glucide végétale.
Sprofit	Rawlands	Boisson à base de sucre et de maltodextrines.
Toshu Cha	Hitachi Zosen Corp.	Thé fortifié en calcium.
Ladys Can Fed	Meiji Seika	Confiserie enrichie en fer, vitamines et fructooligosaccarides.
Yugao Bijln	Tokyo Tanebe Co.	Pâtes alimentaires faites de fibres de fruits.
LC1	Nestlé	Yogourt à base de <i>lactobacillus acidophilus</i> .
Danone Actimel	Danone	Produit laitier à base de <i>lactobacillus acidophilus</i> .
Probioplus	ND ²	Produit laitier à base de <i>lactobacillus acidophilus</i> et <i>casei</i> .
Symbalance 2	ND ²	Produit laitier à base de 5 bactéries lactiques.

¹ adapté de Paquin et Gauthier (1995); Pitts (1995) et Klont et Mannion (1996).

² ND: Non Disponible.

Dans le cas du Canada, la législation est plus sévère et ne permet pas l'affichage d'allégations «santé» sur les étiquettes alimentaires. En fait, la réglementation canadienne exige que les produits faisant mention d'actions thérapeutiques ou pharmacologiques soient classés dans la catégorie des médicaments et des drogues. Ces contraintes limitent donc la commercialisation des nutraceutiques au Canada (Paquin et Gauthier, 1995).

Mais les étiquettes alimentaires ne sont pas le seul critère de vente des produits nutraceutiques et les industriels intéressés par ce marché l'on bien compris. En fait, les consommateurs des pays industrialisés ont tendance à développer une certaine autonomie face à leur santé, et leur éducation par les médias influence fortement leur choix de consommation. Les médias jouent donc un rôle de premier plan dans le marché des nutraceutiques en informant le consommateur des vertus médicinales des aliments fonctionnels (Hunt, 1994; DeFelice, 1995; Kevin, 1995; Morel, 1995; Pitts, 1995; Best, 1996a; Klont et Mannion, 1996; Pilley, 1996; Toursel, 1997; Hilliam, 1998). Selon Potter (1995), une allégation «santé» n'est pas essentielle si le consommateur connaît les propriétés thérapeutiques d'un ingrédient. Dans ces conditions, la seule indication de la présence de cet ingrédient sur l'étiquette d'un produit est suffisante pour orienter le choix du consommateur envers ce produit.

Selon plusieurs auteurs (Salji, 1994; Sfiligoj, 1994; Hollingsworth, 1996; Ohr, 1998), le succès des nutraceutiques repose d'abord sur les qualités organoleptiques du produit. En effet, une étude a démontré que 90% des consommateurs choisissent d'abord un produit alimentaire pour son goût (Sloan et Stiedemann, 1996). Cette exigence pose donc des défis supplémentaires à l'industrie alimentaire qui doit contourner, par exemple, le goût crayeux du calcium et des fibres ou l'amertume du potassium et des hydrolysats de protéines dans les produits fortifiés en ces composantes (Giese, 1995; Toursel, 1996).

Actuellement, le véhicule de nutraceutique le plus répandu est la boisson non alcoolisée qui représente plus de 50 pourcent du marché japonais (Paquin et Gauthier, 1995). Dans ces boissons, une gamme variée de composantes nutraceutiques sont ajoutées telles des minéraux, des vitamines, des protéines, des fibres, etc. (Sfiligoj, 1994; Paquin et Gauthier, 1995; Toursel, 1998). La consommation de ces jus permet donc d'obtenir une source supplémentaire en

nutriments essentiels, en remplacement des comprimés ou des complexes de minéraux qui sont moins populaires auprès des consommateurs. De plus, des études ont démontré que l'absorption des nutriments est souvent supérieure dans les aliments fortifiés, comparé à celle obtenue dans le cas des comprimés et des suppléments (Paquin et Gauthier, 1995). Pour l'industrie laitière, la fortification des boissons non alcoolisées s'avère donc intéressante pour la valorisation du lactosérum de fromagerie.

1.2 LES BOISSONS À BASE DE LACTOSÉRUM

Dans le domaine des boissons, l'utilisation du lactosérum a été largement exploitée. Par exemple, le lactosérum a été ajouté à des boissons à base d'alcool, comme la bière ou le vin, mais aussi à des boissons sans alcool (gazeuses ou non) comme les jus aromatisés ou les boissons aux fruits. Bien que le lactosérum soit reconnu pour son pouvoir désaltérant, son addition à des boissons vise généralement un objectif nutritionnel. En effet, le lactosérum contient des protéines d'excellente qualité nutritive et il est riche en certains minéraux et vitamines. La présence de ces éléments dans le lactosérum en fait donc un produit hautement nutritif (Jelen et al., 1987; Dodds, 1989; Gandhi, 1989; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992; Vojnovic et al., 1993; Giese, 1995; McCue, 1996).

Dans les boissons, le lactosérum est additionné sous différentes formes selon les traitements appliqués au produit: lactosérum brut, déprotéiné ou déminéralisé, concentrés de protéines ou ingrédient hydrolysé (Jelen, 1983; Jelen et al., 1987; Tuohy et al., 1988; de Wit, 1989b; Gandhi, 1989; Mann, 1989; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992; Swartz, 1995). La plupart du temps, le lactosérum est déprotéiné par ultrafiltration ou précipitation acide et ce, afin d'éliminer les composés azotés causant de la turbidité et/ou des défauts de saveur dans les boissons (Tuohy et al., 1988; Sienkiewicz et Riedel, 1990). Jusqu'à présent, l'utilisation d'ingrédients hydrolysés a toutefois été réservée aux boissons nutritionnelles du type formules entérales, formules hypoallergènes pour nourrissons ou encore, à la préparation de produits destinés aux individus souffrant d'intolérance au lactose; pour ce dernier type de produit, c'est évidemment la fraction glucidique (lactose) qui subit l'hydrolyse enzymatique (Swartz, 1995).

La façon la plus économique d'utiliser le lactosérum dans les boissons est sous sa forme brute. Toutefois, la délipidation du lactosérum est nécessaire pour éviter d'altérer la qualité organoleptique des boissons. De plus, la présence des lipides dans les boissons acides peut conduire à la coagulation des protéines sériques qui sont utiles à la stabilité de la mousse dans le produit (Sienkiewicz et Riedel, 1990). À partir d'un lactosérum délipidé, seule une étape de pasteurisation et d'aromatisation sont alors nécessaires pour produire un breuvage à base de lactosérum: le produit final est une boisson contenant peu de protéines et une teneur élevée en glucides (de Wit, 1989b; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992). Selon Jelen (1992), le contenu en glucides de ce type de boisson est souvent supérieur à celui des boissons gazeuses et des jus de fruits. Toutefois, la saveur sucrée du produit demeure acceptable étant donné le faible pouvoir sucrant du lactose.

Le lactosérum déprotéiné est un ingrédient riche en minéraux et en lactose utilisé dans la fabrication de boissons rafraîchissantes et nutritives. Cet ingrédient peut aussi subir la fermentation du lactose pour s'ajouter ensuite à des boissons gazeuses ou non gazeuses (Sienkiewicz et Riedel, 1990). Selon Jelen (1992), le contenu élevé en calcium du lactosérum, spécialement du lactosérum acide, peut se prêter avantageusement à la fortification d'aliments, notamment les boissons. La déminéralisation du lactosérum, quant à elle, aurait comme objectif le retrait des ions monovalents pour diminuer son goût salé.

Les concentrés de protéines de lactosérum obtenus par ultrafiltration, de même que la fraction résiduelle générée par ce procédé (perméat), sont tous deux utilisés dans la fabrication de boissons (Jelen et al., 1987; de Wit, 1989b; Gandhi, 1989; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992; Vojnovic et al., 1993). Par exemple, le perméat peut être utilisé dans la fabrication de breuvages alcooliques traditionnels comme la bière. Suite à l'hydrolyse du lactose, le perméat peut aussi être utilisé dans la production de boissons gazeuses (Jelen, 1992). Dans le cas des concentrés protéiques (30-70%), ils sont généralement utilisés pour augmenter la valeur nutritionnelle des boissons. Jelen (1992) et de Wit (1989b) ont même proposé l'ajout des protéines de lactosérum aux boissons gazeuses dans le but de rehausser l'image de ces breuvages à calories vides. Selon de Wit (1989b), une boisson gazeuse peut facilement être fortifiée à plus de 1% de protéines de lactosérum. Cependant, à plus fortes concentrations

(>3%) en protéines, la saveur typique de la boisson est affaiblie en raison de la fixation des protéines aux composantes aromatiques de la boisson (de Wit, 1989b).

Selon Mangino (1992), l'addition des protéines de lactosérum aux boissons est facilitée par la bonne solubilité de ces protéines à leur point isoélectrique. À pH acide (<3.8), les protéines de lactosérum seraient résistantes à la coagulation lors du traitement de pasteurisation des boissons (Tuohy et al., 1988; Jelen, 1992). Cependant, des interactions avec les hydrocolloïdes (pectines) présents dans les boissons peuvent conduire à la formation d'un réseau gélifié ou encore, augmenter la précipitation des protéines dans le produit (Jelen et al., 1987; de Wit, 1989b; Jelen, 1992).

Dans le cas des boissons aux fruits, le lactosérum présente l'avantage d'être compatible avec les jus à base d'agrumes comme les oranges, le pamplemousse et le citron. Dans ces jus, le lactosérum est facile à mélanger et sa saveur de «petit lait» est bien masquée. Par exemple, le *Rivella* est une boisson gazeuse trouvée en Suisse. Sur le marché suédois, on trouve également le *Nature's Wonder*, une boisson aux fruits. Malgré sa compatibilité avec les agrumes, le lactosérum a aussi été utilisé dans les jus de pommes et de tomates, dans les laits au chocolat et les breuvages fermentés (Anonyme, 1983; Jelen et al., 1987; Tuohy et al., 1988; de Wit, 1989b; Dodds, 1989; Gandhi, 1989; Mann, 1989; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992). Le tableau 1.2 présente une variété de boissons à base de lactosérum qu'on trouve sur le marché.

Actuellement, la consommation de boissons à base de lactosérum est en forte croissance dans certains pays d'Europe, notamment en Suisse, en Allemagne, aux Pays-Bas et en Autriche. De façon générale, ces boissons contiennent des proportions de lactosérum brut variant de 33% à 90% (Jelen et al., 1987; Tuohy et al., 1988; Jelen, 1992). En Allemagne, une réglementation définit l'utilisation du lactosérum dans les boissons. En effet, ces boissons doivent contenir au moins 51% de lactosérum sous forme liquide ou solide (Sienkiewicz et Riedel, 1990).

Tableau 1.2: Boissons à base de lactosérum trouvées sur le marché européen¹.

Boissons (Pays)	Type de boisson	Caractéristiques
Big M (Allemagne)	Breuvage aux fruits	Lactosérum brut avec ajout de saveur et de vitamine E.
Mango-molke-mix (Allemagne)	Breuvage aux fruits	Lactosérum brut, jus de mangue et culture bactérienne.
Frucht-molke-nektar (Allemagne)	Breuvage aux fruits	Lactosérum brut et 25% de concentré de jus d'orange.
Rivella (Suisse)	Boisson gazeuse	Lactosérum déprotéiné et de l'eau.
Fit (Suisse)	Breuvage aux fruits	Lactosérum et 15% de jus de mangue ou de pamplemousse.
Nature's Wonder (Suède)	Breuvage aux fruits	Concentré de protéines de lactosérum, lactose hydrolysé et 50% de concentré de jus de fruit de la passion, d'ananas et d'orange.
Morea (France)	Breuvage aux fruits	Lactosérum concentré et 40% de jus de mangue, goyave, kiwi et fruit de la passion.
Djoez (Pays-Bas)	Breuvage aux fruits	Lactosérum brut (80%) et concentré de jus.
Hedelmatarha (Finlande)	Breuvage aux fruits	Lactosérum brut, lactose hydrolysé et jus de mangue ou fruits tropicaux.

¹ adapté de Jelen (1992).

Au Canada, une appellation « jus fortifié en protéines » est permise mais uniquement pour des jus dont la cote protéique est de 20, laquelle se définit comme le coefficient d'efficacité protéique (CEP) de la protéine multiplié par la quantité de protéines (g) ajoutée à une portion de jus de 175 ml. Pour la fortification protéique d'un jus de fruits, il est donc préférable de choisir un ingrédient protéique dont la valeur de CEP et la teneur en protéines sont élevés. L'utilisation d'un ingrédient riche en protéines présente aussi l'avantage de limiter l'ajout d'une quantité importante de composantes non-désirables dans le jus, comme la matière grasse et le lactose.

1.3 LES INGRÉDIENTS À BASE DE LACTOSÉRUM

Le lactosérum doux et le lactosérum acide sont les deux principaux types de lactosérum produit à l'échelle mondiale. Le lactosérum doux (*Sweet whey*) est le résidu de la coagulation du lait entier ou écrémé sous l'action de l'enzyme rennet : présure, et son pH est supérieur à 5.6. Le lactosérum acide (*Acid whey*) est obtenu suite à la coagulation acide du lait lors de la fabrication des caséines ou de la production de fromage cottage, et son pH est inférieur à 5.1. De façon générale, le lactosérum contient du lactose, des protéines, des minéraux et des vitamines (Mulvihill et Donovan, 1987; Morr, 1989; Hambraeus, 1992; Goff et Hill, 1993; Jelen et Rattray, 1995). Sa teneur en protéines sur base humide est de 0.7% et 0.8% pour les lactosérums acide et doux, respectivement. Les protéines représentent donc 10 à 12% des solides totaux du lactosérum (Morr, 1989).

Dans le but d'exploiter les qualités nutritionnelles et fonctionnelles des protéines de lactosérum, des procédés technologiques sont utilisés afin de les concentrer. La figure 1.1 illustre les procédés utilisés en industrie pour la concentration des protéines de lactosérum. Par ultrafiltration et diafiltration, il est possible d'obtenir des concentrés de protéines de lactosérum (CPL) contenant jusqu'à 75% de protéines, alors que les isolats de protéines de lactosérum (IPL), obtenus par échange ionique, contiennent plus de 90% de protéines (Mulvihill et Donovan, 1987; Morr, 1989). Ces procédés minimisent la dénaturation et la modification des protéines et préservent leur solubilité et leur fonctionnalité (Morr, 1989). Suite à ces traitements industriels, divers ingrédients sont obtenus dont les caractéristiques

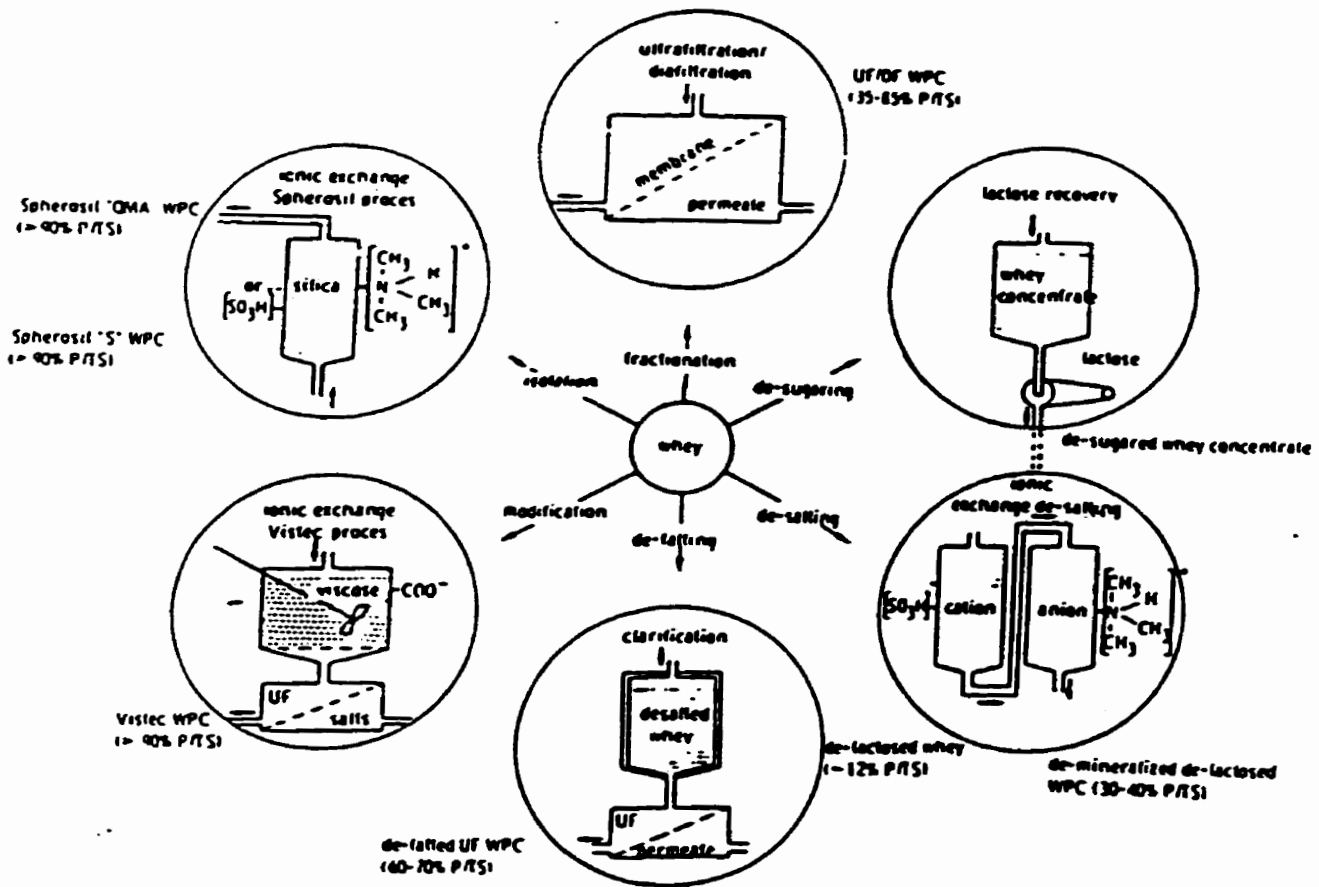


Figure 1.1 : Représentation schématique des procédés utilisés en industrie pour la concentration des protéines de lactosérum (tiré de de Wit et al., 1986).

physico-chimiques sont différentes. Le tableau 1.3 présente des exemples d'ingrédients obtenus à partir du lactosérum.

1.4 LES PROTÉINES DE LACTOSÉRUM

Les principales protéines de lactosérum, solubles à pH 4.6, sont: la β -lactoglobuline (50%), l' α -lactalbumine (12%), les immunoglobulines (10%), la sérum bovine albumine (5%) et la fraction protéose-peptones (23%), laquelle est composée de fragments protéiques (Morr, 1989). Bien que le point isoélectrique (pI) des protéines de lactosérum se situe près du pH des lactosérums acide et doux, la conformation globulaire compacte ainsi que la nature hydrophile de ces protéines prévient leur précipitation isoélectrique (Mulvihill et Donovan, 1987; Morr, 1989; Goff et Hill, 1993). Parmi les protéines de lactosérum, la β -lactoglobuline (β -lg) et l' α -lactalbumine (α -la) sont les protéines qui influencent le plus le comportement du lactosérum lors des traitements industriels. Les caractéristiques de ces protéines seront donc présentées plus en détails.

1.4.1 La β -lactoglobuline

La β -lg (18.3 KDa), protéine majeure du lactosérum, est constituée de 162 résidus d'acides aminés et possède deux ponts disulfures (106-119 et 66-160) et un groupement thiol (-SH) libre en position 121 (Mulvihill et Donovan, 1987; Hambling et al., 1992; Goff et Hill, 1993; Robin et al., 1993; Barbeau et al., 1996). Elle se présente sous la forme d'octamères dans la région de son point isoélectrique (3.5-5.2), de dimères au pH du lait (pH 5.5-7.5), alors qu'à pH supérieur à 6.5, les dimères se dissocient graduellement sous la forme de monomères (Mulvihill et Donovan, 1987; de Wit, 1989a; Hambling et al., 1992; Robin et al., 1993; Barbeau et al., 1996). L'association des molécules de β -lg en fonction du pH est illustrée à la figure 1.2. À des valeurs de pH supérieures à 6.5, la β -lactoglobuline subit des changements physico-chimiques suite à la dénaturation réversible de la protéine. Un changement de conformation maximale est observé à pH 7.5, où la réactivité du groupement thiol libre augmente de façon significative et favorise la formation de ponts disulfures intra- et intermoléculaires, spécialement lors des traitements thermiques. Suite à ces changements, d'importantes modifications des propriétés fonctionnelles

Tableau 1.3: Composition de différents ingrédients à base de lactosérum utilisés dans la fabrication des boissons¹.

Ingrédients Composition (%)	Lactosérum		Lactosérum		Lactosérum		CPL ²	CPL	CPL	IPL ³
	doux	acide	délipidé	déminéralisé	-dé lactosé	(35% prot.)	(56% prot.)	(74% prot.)	(90% prot.)	
Protéines	12	11	60	37	35	56	74	90		
Lipides	3	0.6	0.5	2.8	5	4.8	6.6	0.9		
Lactose	74	69	27	46	50	26	5.4	0.1		
Minéraux	8	12	2.2	2.4	10	4.2	2.6	1.8		
Acide lactique	3	8	0.1	0.3	ND ⁴	0.2	0.1	0.1		

¹Tiré de: Morr (1989; 1992).

²Concentré de protéines de lactosérum

³Isolat de protéines de lactosérum

⁴ND: Non Disponible

de la protéines sont également observées (de Wit, 1989a). Ces propriétés et la stabilité thermique de la β -lg seront présentées aux sections 1.4.3 et 1.4.4.

1.4 LES PROTÉINES DE LACTOSÉRUM

Les principales protéines de lactosérum, solubles à pH 4.6, sont: la β -lactoglobuline (50%), l' α -lactalbumine (12%), les immunoglobulines (10%), la sérum bovine albumine (5%) et la fraction protéose-peptones (23%), laquelle est composée de fragments protéiques (Morr, 1989). Bien que le point isoélectrique (pI) des protéines de lactosérum se situe près du pH des lactosérums acide et doux, la conformation globulaire compacte ainsi que la nature hydrophile de ces protéines prévient leur précipitation isoélectrique (Mulvihill et Donovan, 1987; Morr, 1989; Goff et Hill, 1993). Parmi les protéines de lactosérum, la β -lactoglobuline (β -lg) et l' α -lactalbumine (α -la) sont les protéines qui influencent le plus le comportement du lactosérum lors des traitements industriels. Les caractéristiques de ces protéines seront donc présentées plus en détails.

1.4.1 La β -lactoglobuline

La β -lg (18.3 KDa), protéine majeure du lactosérum, est constituée de 162 résidus d'acides aminés et possède deux ponts disulfures (106-119 et 66-160) et un groupement thiol (-SH) libre en position 121 (Mulvihill et Donovan, 1987; Hambling et al., 1992; Goff et Hill, 1993; Robin et al., 1993; Barbeau et al., 1996). Elle se présente sous la forme d'octamères dans la région de son point isoélectrique (3.5-5.2), de dimères au pH du lait (pH 5.5-7.5), alors qu'à pH supérieur à 6.5, les dimères se dissocient graduellement sous la forme de monomères (Mulvihill et Donovan, 1987; de Wit, 1989a; Hambling et al., 1992; Robin et al., 1993; Barbeau et al., 1996). L'association des molécules de β -lg en fonction du pH est illustrée à la figure 1.2. À des valeurs de pH supérieures à 6.5, la β -lactoglobuline subit des changements physico-chimiques suite à la dénaturation réversible de la protéine. Un changement de conformation maximale est observé à pH 7.5, où la réactivité du groupement thiol libre augmente de façon significative et favorise la formation de ponts disulfures intra- et intermoléculaires, spécialement lors des traitements thermiques. Suite à ces changements, d'importantes modifications des propriétés fonctionnelles

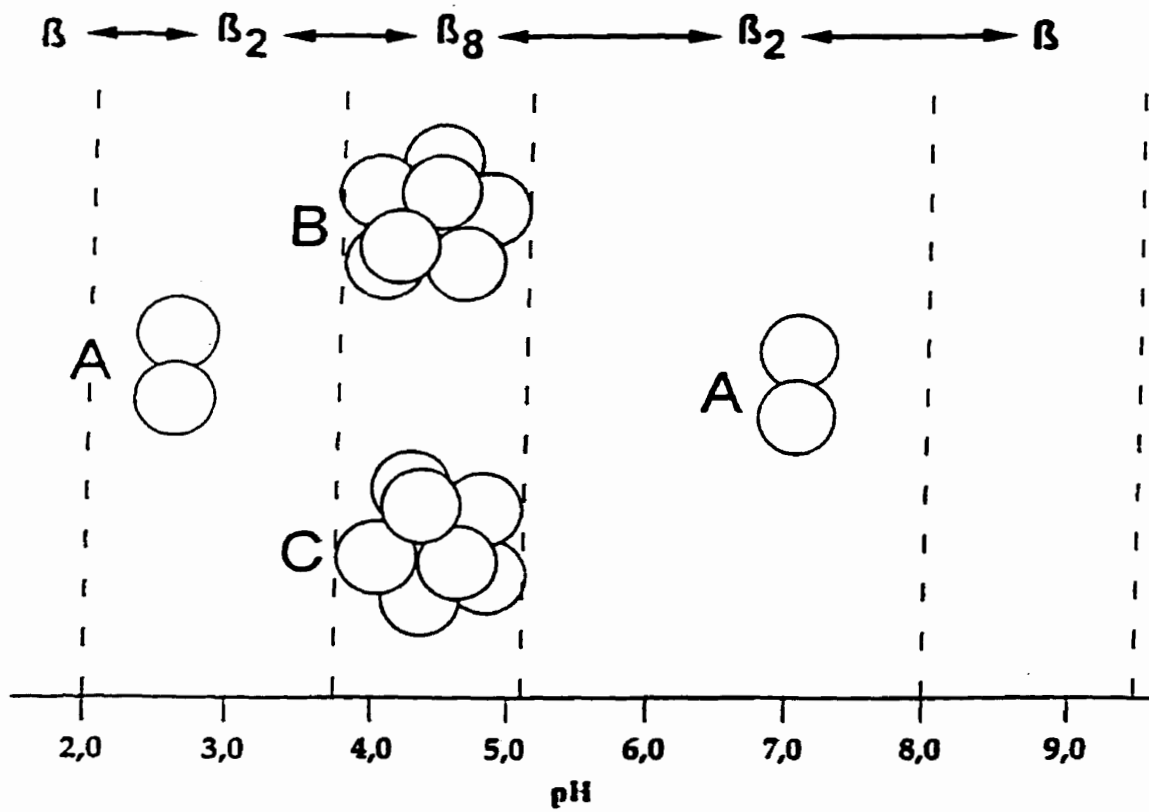


Figure 1.2: Représentation schématique des changements structuraux de la β -lactoglobuline en fonction du pH. Modèle moléculaire: (A) dimère; (B) et (C) octamère. Tiré de Barbeau (1995).

de la protéines sont également observées (de Wit, 1989a). Ces propriétés et la stabilité thermique de la β -lg seront présentées aux sections 1.4.3 et 1.4.4.

1.4.2 L' α -lactalbumine

L' α -la (14.2 KDa) est une métalloprotéine (calcium) qui contient 123 résidus d'acides aminés dont huit groupements cystéine, tous impliqués dans la formation de ponts disulfures (Mulvihill et Donovan, 1987; Brew et Grobler, 1992; Hambraeus, 1992; Goff et Hill, 1993; Robin et al., 1993; Jelen et Rattray, 1995). À pH 4.0, l' α -lactalbumine subit une dénaturation réversible (de Wit, 1989a; de Wit, 1998) responsable de la perte de son ion calcium qui, à pH plus élevé, est fortement lié (de Wit, 1989a; Goff et Hill, 1993). À son point isoélectrique (pH 4.1-4.3), un traitement thermique de quelques minutes à 65°C entraîne la précipitation de la protéine (de Wit, 1989a; Robin et al., 1993). À pH 6.5, l' α -la se dénature à des températures aussi basse que 62°C et perd aussi son ion calcium (de Wit, 1989a; Goff et Hill, 1993; Robin et al., 1993). Des études de solubilité ont démontré que suite à l'augmentation de la température de 20°C à 110°C, 85% de l' α -la était dénaturée, mais de façon réversible (Jelen et Rattray, 1995). La facilité de cette protéine à retrouver sa forme native réside dans sa petite structure (seulement 123 aa) et dans ses quatre ponts disulfures qui limitent les changements de conformation (Jelen et Rattray, 1995).

1.4.3 Les propriétés fonctionnelles des protéines de lactosérum

Les propriétés fonctionnelles sont des caractéristiques physico-chimiques qui contribuent aux qualités, autre que nutritionnelle, d'un produit alimentaire (de Wit, 1989a; Mangino, 1992; Panyam et Kilara, 1996). De façon générale, les facteurs environnementaux comme la température, le pH, la présence de sels et d'autres solutés affectent les propriétés fonctionnelles des protéines (de Wit, 1989a). Parmi ces propriétés, on regroupe la solubilité, la capacité d'absorption d'eau, les propriétés gélifiantes, émulsifiantes et moussantes, etc. (de Wit, 1989a; Mutilangi et al., 1996).

La solubilité des protéines de lactosérum est fonction du pH, de la force ionique et de la température du milieu. Une solubilité minimale est observée au point isoélectrique (pI) des

protéines de lactosérum toutefois, aucune précipitation n'est observée (de Wit, 1989a; Hambling et al., 1992; Robin et al., 1993; Jelen et Rattray, 1995). En s'éloignant du pI, la dénaturation des protéines n'est toutefois pas automatiquement accompagnée d'une perte de solubilité (Jelen et Rattray, 1995). Harwalkar (1979) a démontré que les protéines de lactosérum sont hautement solubles à pH 2.5 suite à un traitement thermique sévère (90°C/30min.), alors qu'elles précipitent à pH 4.6. Aussi, de Wit (1981) a démontré qu'une solution de β -lg à pH 6.5 précipite suite à son traitement thermique (80°C/10min.), mais que la solution demeure translucide si son pH est supérieur à 6.8.

À des valeurs de pH variant de 4.5 à 5.5, l'addition de sel à du lactosérum déminéralisé permet d'augmenter la solubilité (*salting-in*) des protéines jusqu'à un maximum où on assiste alors à une diminution de la solubilité (*salting-out*) (de Wit, 1989a; Mulvihill, 1992; Robin et al., 1993). De façon générale, la solubilité des protéines de lactosérum diminue lors des traitements thermiques à des températures supérieures à 70°C et à des valeurs de pH situées entre 4.0 et 6.5 (de Wit, 1989a; Jelen et Rattray, 1995). Cette perte de solubilité a des conséquences majeures sur les propriétés moussantes et émulsifiantes des protéines (de Wit, 1989a). La solubilité gagne en importance lorsque la clarté du produit, comme dans les boissons, est capitale (de Wit, 1989a).

L'absorption d'eau est définie par la quantité d'eau associée à une certaine quantité de protéines (Mulvihill et Fox, 1989). L'absorption d'eau est influencée par la présence de groupements ionisables, le pH, la présence de sels et la température (Robin et al., 1993). La composition en acides aminés influence la capacité des protéines à absorber l'eau. Les groupements polaires des protéines (carboxyl, hydroxyl et thiol) ont tendance à lier facilement les molécules d'eau, ce qui contribue à leur capacité d'absorption des molécules d'eau. Au pI, la capacité des protéines à absorber des molécules d'eau est minimale puisque la charge nette de la protéine est nulle. Une faible concentration en sel dans le milieu améliore l'absorption d'eau toutefois, une forte concentration la diminue. L'absorption d'eau étant un phénomène exothermique, l'augmentation de la température diminue l'absorption d'eau (Robin et al., 1993). L'absorption d'eau des protéines de lactosérum est spécialement importante dans les aliments comme les breuvages, les soupes et les saucisses puisqu'elle joue un rôle déterminant sur la texture (viscosité, gélification) des ces aliments (de Wit, 1989a).

Les protéines de lactosérum présentent d'excellentes propriétés gélifiantes, qui sont exploitées notamment dans les produits laitiers (fromage, yogourt), les produits de boulangerie-pâtisserie et les charcuteries (Robin et al., 1993). Cependant, ces propriétés sont non désirées dans les produits tels que les breuvages, les desserts glacés et les *dairylike products*. (Mulvihill et Kinsella, 1987; Mangino, 1992; Xiong et al., 1993; Ju et al., 1995; Otte et al., 1996; Madsen et al., 1997).

Dans le lactosérum, la β -lg serait la principale protéine responsable des propriétés gélifiantes (Mulvihill et Fox, 1989). En outre, un gel transparent est obtenu par chauffage d'une solution de β -lg à pH supérieur à 7.0, et des interactions hydrophobes ($\text{pH} < 3.5$) ou la formation de ponts disulfures (S-S) entre les protéines seraient responsables de la formation du gel (de Wit, 1989a). À pH 6.0, un gel opaque serait obtenu suite au chauffage de la solution (de Wit, 1989a).

Le caractère amphiphile des protéines de lactosérum leur confère aussi de bonnes propriétés moussantes (Mulvihill et Fox, 1989). La stabilité des mousses est toutefois supérieure après délipidation et dénaturation des protéines de lactosérum. En effet, un traitement thermique à 40°C des protéines de lactosérum améliore leurs propriétés moussantes alors que la présence de lipides (phospholipides ou acides gras insaturés par exemple) les affaiblit (de Wit, 1989a). Une stabilité maximale des mousses à base de protéines de lactosérum est observée à des valeurs de pH situées entre 4 et 5 (de Wit, 1989a).

Généralement, les protéines sont de bons agents tensio-actifs et elles sont donc utilisées pour stabiliser les interfaces huile/eau d'une émulsion. Lors de la formation d'une émulsion à partir de protéines, trois étapes sont essentielles: 1) la diffusion des protéines à l'interface; 2) leur adsorption, et finalement; 3) leur étalement à l'interface suivant un changement de leur conformation (Mulvihill et Fox, 1989). Les facteurs comme la concentration en protéines, le pH, la solubilité des protéines, le présence de sels ou d'autres solutés de même que la température influencent les propriétés émulsifiantes des protéines (de Wit, 1989a).

Les propriétés émulsifiantes, la conformation et la charge des protéines de lactosérum sont influencées par le pH et la force ionique du milieu. Une augmentation de la température accélère

le processus de déstabilisation par l'abaissement de la viscosité de la phase continue ou même par la dénaturation partielle des protéines. De façon générale, augmenter la concentration en sels ou chauffer au-dessus de 70°C une solution protéique, diminue les propriétés émulsifiantes des protéines de lactosérum (de Wit, 1989a). De plus, chauffer une émulsion qui est stabilisée par des protéines de lactosérum à une concentration supérieure à 6% induit la formation d'un gel (de Wit, 1989a).

1.4.4 La stabilité thermique des protéines de lactosérum

La structure native d'une protéine dépend de sa composition en acides aminés et de leur enchaînement (structure primaire), mais également des conditions physico-chimiques de son milieu naturel (Mulvihill et Donovan, 1987). Lors de la dénaturation d'une protéine, les forces (liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, etc.) stabilisant sa structure native sont rompues et la molécule adopte alors une conformation différente (dénaturation) de celle de sa structure native (Mulvihill et Donovan, 1987; Jelen et Rattray, 1995). Mulvihill et Donovan (1987) définissent la dénaturation comme une altération majeure de la structure native d'une protéine, sans toutefois modifier sa structure primaire. Souvent, des sites réactifs initialement enfouis à l'intérieur de la protéine sont exposés suite aux changements de conformation de la protéine et peuvent ainsi interagir avec d'autres molécules (Mulvihill et Donovan, 1987).

Les changements de conformation des protéines peuvent être de nature réversible ou irréversible selon l'intensité du traitement subi (Donovan et Mulvihill, 1987; Mulvihill et Donovan, 1987; Britten et al., 1994; Jelen et Rattray, 1995; Barbeau et al., 1996). De façon générale, l'effet d'un traitement thermique sur une protéine est caractérisé par deux étapes: la première étape implique le déplissement de la protéine et la deuxième conduit à l'agrégation irréversible des molécules protéiques (Mulvihill et Donovan, 1987; de Wit, 1998). Une dénaturation est considérée comme irréversible lorsque la protéine subit des changements qui rendent impossible le retour de la molécule à son état natif (Mulvihill et Donovan, 1987). Ce type de dénaturation peut mener à la coagulation, à la précipitation et/ou à la formation d'un gel (Mulvihill et Donovan, 1987). Les principaux facteurs influençant la dénaturation sont: la température, le pH, les sels, la concentration protéique ainsi que la présence de solutés et de solvants organiques (de Wit et

Klarenbeek, 1984; Donovan et Mulvihill, 1987; Mulvihill et Donovan, 1987; de Wit, 1989a; Jelen et Rattray, 1995; Farrag, et al., 1997; de Wit, 1998).

Les traitements thermiques sont les procédés qui affectent le plus la fonctionnalité des protéines de lactosérum (Jelen et Rattray, 1995). La baisse de solubilité est la conséquence majeure de la dénaturation des protéines de lactosérum toutefois, leurs propriétés moussantes et émulsifiantes sont également affectées (Mulvihill et Donovan, 1987; de Wit, 1989a; Britten et al., 1994; de Wit, 1998). Souvent indésirables, les traitements de chaleur peuvent par contre améliorer les flux de perméation lors de l'ultrafiltration du lactosérum (Jelen et Rattray, 1995) pour la fabrication de CPL ou encore, améliorer la fonctionnalité des protéines de lactosérum pour leur utilisation dans les produits carnés ou les céréales (Mulvihill et Donovan, 1987). Les effets des traitements de chaleur sur les protéines de lactosérum dépendent toutefois des conditions environnantes comme le pH, la concentration en protéines et la présence d'ions (Schmidt et al. 1984; Shimada et Cheftel, 1988; de Wit, 1989a; Robin et al. 1993; Mutilangi et al., 1996; Panyam et Kilara, 1996).

À température pièce (20°C) et à pH 7.0, les formes monomériques et dimériques de la β -lg sont en équilibre (Mulvihill et Donovan, 1987; Jelen et Rattray, 1995). Lorsque la température est augmentée au-dessus de 30°C, une conversion des dimères en monomères est observée et la réactivité du groupement thiol libre est augmentée (Mulvihill et Donovan, 1987; Hambling et al., 1992; Jelen et Rattray, 1995). Au-dessus de 40°C, la β -lg subit un léger changement de conformation, mais cette dénaturation est réversible (Mulvihill et Donovan, 1987; Jelen et Rattray, 1995). À partir de 70°C, la β -lg subit alors une dénaturation irréversible. À cette température, on assiste au bris des ponts disulfures intramoléculaires, à l'exposition du groupement thiol libre et à des associations qui entraînent une polymérisation de la β -lg. Cette polymérisation est observée suite à la formation de liens disulfures intermoléculaires. Une conséquence directe de cette polymérisation est la production d'agrégats insolubles (Mutilangi et Kilara, 1985; Donovan et Mulvihill, 1987; Mulvihill et Donovan, 1987; Dalgleish, 1990; Hambraeus, 1992; Hollar et al., 1995; Mutilangi et al., 1996; Farrag et al., 1997; Parris et al., 1997).

Le pH du milieu affecte la température de dénaturation de la β -lg (Jelen et Rattray, 1995). De façon générale, la température de dénaturation de la β -lg diminue lorsque le pH du milieu augmente (Jelen et Rattray, 1995). À pH 3, la structure compacte de la β -lg est peu modifiée (de Wit, 1989a). La protéine présente une stabilité thermique maximale autour de pH 3.5 (de Wit, 1989a). À des valeurs de pH près de la neutralité (6.5-7.0), la température de dénaturation de la β -lg est de 75-80°C (Jelen et Rattray, 1995). À pH supérieur à 5.5, les forces de répulsion entre les protéines sont plus faibles et on assiste alors à la précipitation des protéines (de Wit, 1989a).

La présence de lactose et d'ions (Na^+ , Cl^-) stabilise la β -lg lors des traitements thermiques. Cependant, la présence de lactose dans le milieu peut initier la réaction de brunissement non-enzymatique (Réaction de Maillard) (Park et Lund, 1984; Mulvihill et Donovan, 1987; Harwalkar et Ma, 1990; Hambling et al., 1992). Hollar et al. (1995) et Parris et al. (1997) ont démontré que la quantité d'agrégats insolubles diminuait suite à la réduction de la concentration en calcium dans une solution de CPL à 65% de protéines. Par contre, Donovan et Mulvihill (1987) ont démontré que l'addition de calcium à du lactosérum doux n'avait pas d'effet significatif à des valeurs de pH situées entre 5.1 et 6.0, alors qu'à des pH plus élevé (>6.0), le calcium augmente de façon significative la quantité d'agrégats protéiques.

1.4.5 La valeur nutritionnelle et les vertus thérapeutiques des protéines de lactosérum

Les avantages nutritionnels et les vertus thérapeutiques des protéines de lactosérum sont nombreux. Le contenu en acides aminés essentiels d'une protéine est le premier critère qui détermine sa qualité nutritionnelle, laquelle peut-être évaluée à l'aide du CEP qui représente le gain de masse corporelle (en gramme) obtenu par gramme de protéines ingérées (O'Carroll, 1998). Les protéines de lactosérum sont reconnues pour leur excellente qualité nutritionnelle, avec un CEP de 3.6, et pour leur richesse en certains acides aminés essentiels comme l'isoleucine, la leucine, la thréonine et le tryptophane (Hambraeus, 1992; Britten et al., 1994; Ziajka et., 1994; Castro et al., 1996; de Wit, 1998; O'Carroll, 1998).

Mise à part leur qualité nutritive, les protéines de lactosérum sont aussi bénéfiques à la santé des individus et ce, sous plusieurs aspects. En effet, plusieurs travaux de la littérature ont démontré

une relation étroite entre l'ingestion des protéines de lactosérum et l'amélioration de certains états pathologiques. Par exemple, la richesse en calcium du lactosérum en fait un ingrédient de choix pour les individus souffrant d'ostéoporose (van Moursel, 1997). Les protéines de lactosérum sont également reconnues pour réduire les concentrations plasmiqes en cholestérol (Zhang et Beynen, 1993). En effet, il a été démontré que chez le nourrisson, l'ingestion de formules lactées à base de protéines de lactosérum, plutôt qu'à base de caséines, permettait d'abaisser le taux de cholestérol plasmiqes (Tseng et al., 1990). Chez le rat, l'effet hypocholestérolémiant des protéines de lactosérum a été attribué à une inhibition de la synthèse hépatique du cholestérol (Zhang et Beynen, 1993).

Certaines composantes protéiques du lactosérum présentent aussi des propriétés immunologiques (Ogra et Ogra, 1978; Juto et Ogra, 1978; Stoeck et al., 1989; Mincheva-Nilsson et al., 1990; Watson, 1990; Barta et al., 1991; Wong et Watson, 1995). Par exemple, les immunoglobulines (Ig) bovines ont été reconnues pour être efficaces contre certains types d'entéropathies chez l'humain (Hilpert et al., 1977; Ebina et al., 1985; Brüssow et al., 1987; Hilpert et al., 1987; Tacket et al., 1988). Chez l'animal, l'effet protecteur des anticorps du lactosérum contre plusieurs types d'infections a également été démontré par de nombreux auteurs (Bridger et Brown, 1981; Saif et al., 1983; Michalek et al., 1987).

Le rôle de la lactoferrine dans l'absorption du fer est également bien documenté. Chez des rats anémiques, il a été démontré qu'une ingestion orale journalière de lactoferrine saturée en fer permettait d'augmenter la densité des érythrocytes et les valeurs d'hématocrite et d'hémoglobine, contrairement à une ingestion de sulfate ferreux (Kawakami, 1994). Les résultats de ces travaux suggèrent que le fer lié à la lactoferrine serait absorbé par la muqueuse intestinale, via un mécanisme différent de celui utilisé pour le transport des sels solubles de fer. Il semble donc que la lactoferrine saturée en fer pourrait prévenir une anémie causée par une déficience en fer et ce, à des doses en fer 10 fois plus faibles que celles administrées pour le traitement de ce type d'anémie.

Bounous et al. (1993) ont également démontré un effet bénéfique des protéines de lactosérum chez des patients souffrant du SIDA. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que l'addition

de protéines de lactosérum non-dénaturées à l'alimentation des patients pour une durée de 3 mois permettait une augmentation progressive de leur poids corporel et une normalisation du contenu en glutathion des cellules mononuclées chez ces patients.

Les travaux de Papenburg et al. (1990) ont aussi démontré l'effet positif des protéines de lactosérum (Lacprodan-80) sur le développement d'un cancer du colon chez la souris. Après 28 semaines d'alimentation de souris avec un régime contenant 20g/100g de protéines de lactosérum, les auteurs ont noté une baisse significative du nombre de tumeurs de même qu'une réduction de la surface intestinale atteinte. D'autres travaux ont également démontré des résultats similaires à ceux de Papenburg et al. (1990), en outre les résultats de Bounous et al. (1988a, b) et Wong et Watson (1995) obtenus chez la souris, de même que les travaux de McIntosh (1993) réalisés chez le rat.

En raison de leur qualité nutritive et leurs nombreuses propriétés biologiques, les protéines de lactosérum sont donc un ingrédient de choix pour la formulation de produits nutraceutiques. Actuellement, les protéines de lactosérum sont avantageusement utilisées dans les boissons nutritionnelles, incluant les formules lactées, les préparations gériatriques, les produits à haute valeur protéique (produits minceurs, nutrition sportive, etc.) et les produits «santé».

1.5 LES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES DE PROTÉINES

Les hydrolysats protéiques sont des produits à base de protéines hydrolysées, i.e. où les protéines ont été scindées en composantes de plus faibles poids moléculaires (polypeptides, peptides et acides aminés). L'hydrolyse des protéines est alors obtenue par l'utilisation d'acides, de bases ou d'enzymes hydrolytiques (protéases). Toutefois, l'hydrolyse enzymatique est de loin préférée aux méthodes chimiques pour la production d'hydrolysats protéiques destinés à la préparation d'ingrédients fonctionnels ou nutritionnels (Lahl et Braun, 1994). En fait, le plus grand avantage de l'utilisation d'enzymes pour la fabrication d'hydrolysats protéiques réside dans la spécificité de ces molécules, permettant de contrôler le profil des segments protéiques libérés lors de la réaction d'hydrolyse (Blenford, 1994). Il est donc possible, par un choix judicieux de l'enzyme, de la nature du substrat protéique et des conditions réactionnelles, de moduler et de prévoir la

composition d'un hydrolysat protéique de manière à rencontrer les exigences d'une application particulière (Blenford, 1994).

De façon générale, l'hydrolyse des protéines est réalisée pour les raisons suivantes (Kester et Richardson, 1984; Feeney, 1986; Lahl et Grindstaff, 1989; Panyam et Kilara, 1996): 1) pour modifier les propriétés fonctionnelles d'une protéine telles la solubilité, la viscosité, les propriétés moussante, émulsifiante ou gélifiante; 2) pour éliminer des odeurs et des saveurs indésirables ou encore, pour développer certains saveurs; 3) pour éliminer ou inhiber certains facteurs toxiques contenus dans les substrats protéiques; 4) pour améliorer les propriétés nutritionnelles d'une protéine, en particulier sa digestibilité; 5) pour réduire l'allergénicité de certaines protéines alimentaires; 6) pour libérer certains peptides démontrant des activités biologiques.

1.5.1 Procédés de fabrication des hydrolysats protéiques

À l'échelle industrielle, la préparation d'un hydrolysat protéique est assez simple. À titre d'exemple, la figure 1.3 présente un schéma simplifié pour la fabrication industrielle d'un hydrolysat de protéines.

De façon générale, l'hydrolyse d'une protéine implique sa mise en solution, l'ajustement des conditions du milieu (T° , pH, etc.) et la retenue du mélange dans une cuve thermostatée pour la durée de la réaction d'hydrolyse (1 à 24 heures). Selon la protéine et l'enzyme utilisées, de même que de l'application envisagée, certains traitements sont parfois appliqués au mélange protéique, en aval ou en amont de la réaction d'hydrolyse. Par exemple, la réaction d'hydrolyse peut être accélérée par le traitement thermique préalable d'une protéine peu susceptible, sous sa forme intacte, à l'action d'une enzyme particulière. Aussi, il arrive que la composition d'un hydrolysat protéique, en terme de poids moléculaire de ses composantes peptidiques, soit ajustée par ultrafiltration du mélange hydrolysé afin de répondre aux exigences d'une application particulière. Dans certains cas, l'hydrolysat peut également subir une étape de désamérisation, nécessitant une deuxième réaction enzymatique, le passage de la solution sur une résine

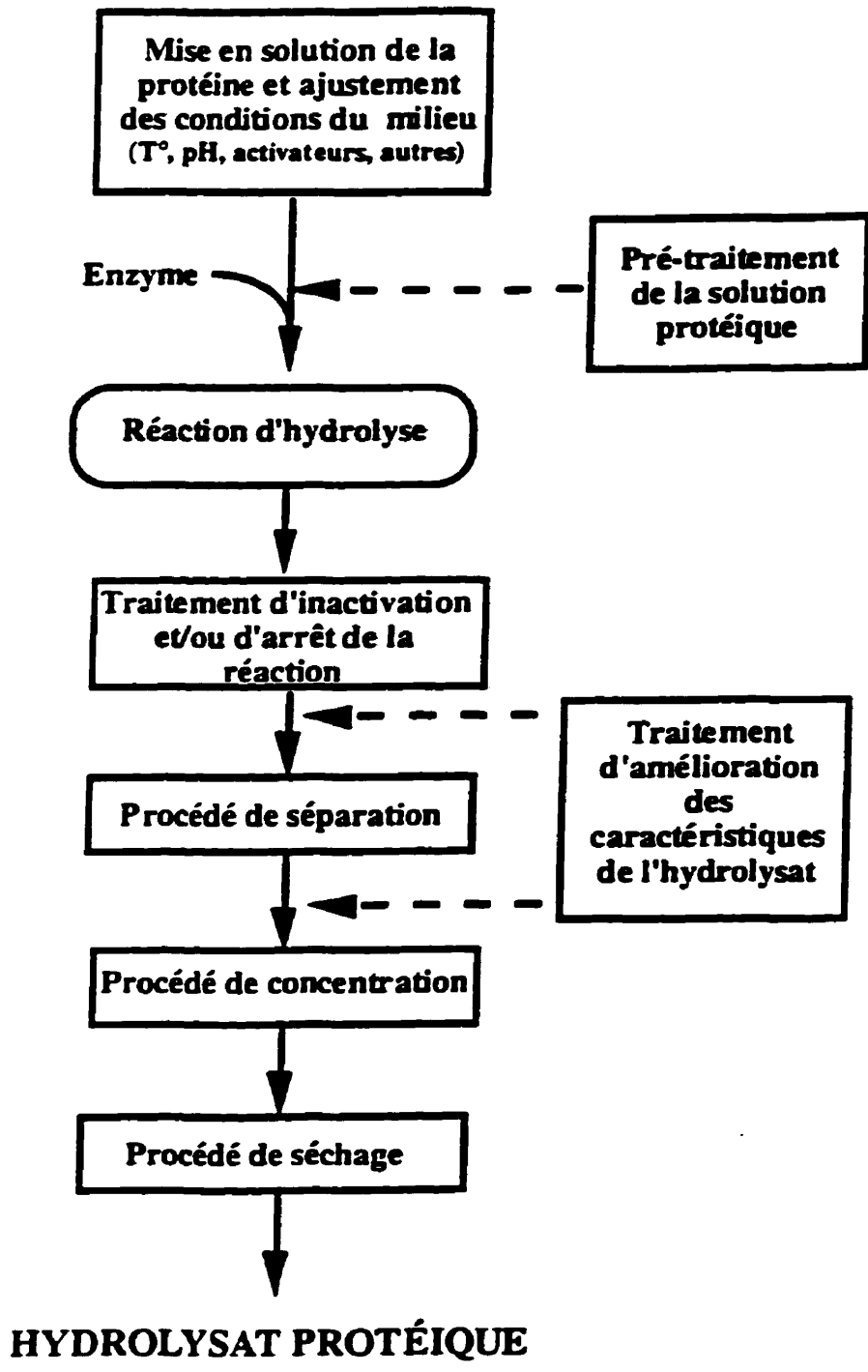


Figure 1.3: Procédé de fabrication d'un hydrolysat protéique (Gauthier, 1996).

adsorbante ou encore, l'ajout d'un composé permettant de masquer l'amertume (Lahl et Braun, 1994; Pedersen, 1994).

La mise au point d'un procédé industriel pour la fabrication d'un hydrolysats enzymatique de protéines exige donc un certain nombre de choix: 1) la sélection du substrat protéique et si nécessaire, un pré-traitement pour modifier la protéine; 2) la sélection de l'enzyme et des conditions d'hydrolyse; 3) la sélection d'un mode de contrôle de la réaction d'hydrolyse; 4) la sélection d'un traitement d'inactivation ou d'élimination de l'enzyme; 5) la sélection d'un mode de séparation de l'hydrolysats si nécessaire; 6) la sélection d'un traitement pour améliorer certaines des caractéristiques de l'hydrolysats si nécessaire (ex.: désamérisation); 7) la sélection d'un mode de contrôle de la qualité du produit final.

1.5.2 Les protéases

Pour la fabrication d'hydrolysats enzymatiques de protéines, les protéases sont les enzymes utilisées pour accomplir la réaction d'hydrolyse. En fait, les protéases sont des molécules protéiques dotées d'une activité catalytique et spécifique, permettant d'accélérer et de contrôler la réaction d'hydrolyse.

Les protéases sont classées selon leur mécanisme d'action, endoprotéases ou exopeptidases, et selon leur spécificité, i.e. leur capacité à reconnaître certains acides aminés et à hydrolyser uniquement les liens peptidiques constitués de ces acides aminés. Sur la base de ces deux critères, une multitude de protéases sont disponibles sur le marché pour la fabrication d'hydrolysats protéiques. De façon générale, les enzymes utilisées couramment pour la fabrication d'hydrolysats protéiques à l'échelle commerciale sont des endoprotéases, les principales étant les suivantes: trypsine, chymotrypsine, pancréatine, papaïne, ficine, bromeline, alcalase, neutrase, corolase, etc.

Le choix d'une enzyme ou d'un mélange enzymatique pour la fabrication d'un hydrolysats protéique dépend du type d'applications envisagées pour cet hydrolysats, mais également du coût de l'enzyme qui peut varier considérablement selon son origine (animale, végétale, bactérienne,

fongique) (Panyam et Kilara, 1996). Par exemple, le coût d'un extrait de trypsine d'origine animale et de grade pharmaceutique (oral grade) s'élève à environ 3000\$CAN/Kg, alors que celui de l'alcalase d'origine bactérienne est de quelques dollars le kilogramme. Il est donc évident que le coût de l'enzyme a un impact considérable sur le prix de l'ingrédient final.

1.5.3 Les conditions d'hydrolyse

Généralement, l'hydrolyse des protéines à l'échelle commerciale est réalisée en « batch », dans des cuves thermostatées de manière à contrôler la température réactionnelle et à appliquer un traitement thermique de désactivation de l'enzyme en fin de réaction. Le substrat protéique (S) et l'enzyme (E) sont habituellement solubilisés en milieu aqueux selon un ratio (E:S) prédéterminé, lequel sera fonction de l'activité spécifique (unités d'enzymes/mg de protéine) de l'enzyme, de son coût et de la durée d'hydrolyse désirée. La température et le pH de la réaction seront sélectionnés, le plus souvent, en fonction des conditions optimales d'activité de l'enzyme. Rappelons que dans un procédé d'hydrolyse enzymatique, l'enzyme représente le réactif le plus coûteux et qu'il faut donc optimiser l'activité de l'enzyme tout en limitant sa désactivation. Les facteurs responsables de la dénaturation protéique sont donc à éviter comme les températures et les pH extrêmes, la création d'interfaces (air/eau, huile/eau, surface eau), l'utilisation d'agents tensio-actifs (ex.: anti-mousse) et la présence d'inhibiteurs. Il faut également vérifier si l'enzyme est plus efficace en présence d'activateurs, comme certains ions (ex.: Ca^{2+}) qui peuvent contribuer au maintien de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme et retarder son inactivation en cours de procédé.

Un dernier facteur à ne pas négliger pour la préparation d'hydrolysats protéiques à l'échelle commerciale, est le contrôle rigoureux de toutes les sources de contaminations microbiologiques pouvant affecter la réaction d'hydrolyse et les propriétés finales du produit. En fait, le substrat et l'enzyme doivent être d'une qualité microbiologique irréprochable et des conditions sanitaires très strictes doivent être appliquées tout au long du procédé d'hydrolyse.

Les conditions d'hydrolyse enzymatique sont également ajustées de manière à contrôler la saveur, la solubilité et certaines propriétés physiques de l'hydrolysat protéique. Dans le cas de la

saveur, c'est l'amertume et le goût salé des hydrolysats protéiques qui sont à considérer. En effet, l'amertume des hydrolysats protéiques est souvent associée à la libération de peptides qui présentent des résidus d'acides aminés hydrophobes en position terminale de la chaîne peptidique (Adler-Nissen, 1976; Adler-Nissen, 1977; Kester et Richardson, 1984; Lahl et Braun, 1994; Gonzalez-Tello et al., 1994; Pedersen, 1994). Pour limiter le développement d'amertume dans un hydrolysat protéique, il faut donc tenir compte de la composition en acides aminés de la protéine, de la durée de la réaction et de la spécificité de l'enzyme utilisée pour son hydrolyse (Pedersen, 1994). Une étape de désamérisation des hydrolysats peut également permettre d'améliorer la saveur de l'hydrolysat et ce, via l'utilisation de résines adsorbantes ou d'enzymes désamérisantes (Pedersen, 1994). D'autre part, le goût salé d'un hydrolysat protéique est généralement lié au contrôle du pH au cours de sa fabrication, via l'ajout d'alcali comme le NaOH. Ce problème peut être minimisé par l'addition d'un mélange de base (NaOH, NH₄OH, KOH) ou encore, en acceptant une baisse d'activité de l'enzyme en cours de réaction par un contrôle moins rigoureux du pH optimal de l'enzyme (Panyam et Kilara, 1996).

1.5.4 Les méthodes de contrôle de la réaction d'hydrolyse

De façon générale, les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles d'un hydrolysat protéique sont fonction du degré d'hydrolyse (DH) de la protéine. Ce facteur doit donc être contrôlé avec précision au cours de la réaction et ce, de manière à déterminer l'arrêt de la réaction au moment où les protéines présentent les propriétés recherchées (Mahmoud, 1994). Pour ce contrôle, plusieurs méthodes sont disponibles telles le ratio AN/TN, la baisse du point de congélation (l'osmolalité) ainsi que la technique du pH-Stat (Lahl et Braun, 1994; Mahmoud, 1994; Panyam et Kilara, 1996; Silvestre, 1997).

Le ratio AN/TN est la quantité d'azote aminé (déterminé par une titration au formaldéhyde) présente dans l'hydrolysat en fonction de l'azote total du substrat protéique (déterminé par Kjeldahl). Par exemple, les protéines fortement hydrolysées présentent un ratio AN/TN supérieur ou égal à 50% (Lahl et Braun, 1994). Dans le cas du pH-Stat, la méthode est basée sur la quantité de base consommée au cours de la réaction d'hydrolyse afin de maintenir le pH réactionnel constant. En fait, chaque fois qu'il y a hydrolyse d'un lien peptidique dans la

protéine, un équivalent base est nécessaire pour neutraliser la libération d'un groupement COOH, qui à pH neutre ou alcalin, se trouve sous forme ionisée (COO⁻). Dans ces conditions, la quantité de base ajoutée au milieu réactionnel est proportionnelle au nombre de liens peptidiques hydrolysés, et cette valeur est donc utilisée pour le calcul du DH (degré d'hydrolyse), un indice abondamment utilisé pour caractériser les hydrolysats protéiques (Lahl et Braun, 1994; Panyam et Kilara, 1996). Le degré d'hydrolyse d'une protéine se définit ainsi:

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

Dans cet indice, h représente le nombre de liens peptidiques hydrolysés et h_{tot} est le nombre total de liens peptidiques dans la protéine (Adler-Nissen, 1976). Le principal avantage de la méthode pH-Stat est sa simplicité d'utilisation à l'échelle commerciale. En fait, seul un contrôle du pH et un mode d'addition d'alcali en cours d'hydrolyse sont requis pour son application en industrie. Toutefois, cette technique ne s'applique pas à des hydrolyses réalisées à pH acide et présente l'inconvénient de minéraliser les hydrolysats par l'ajout d'un alcali (NaOH, KOH, NH₄OH). À noter que le degré d'hydrolyse (DH) d'une protéine peut également être évalué par d'autres techniques plus spécifiques, comme la mesure des groupements α -NH₃ libres à l'aide d'un chromophore.

Enfin, l'osmométrie est aussi une méthode simple utilisée en industrie pour le contrôle de la réaction d'hydrolyse. Cette méthode permet d'évaluer le DH par la chute du point de congélation d'un hydrolysat protéique causée par l'augmentation du nombre de molécules présentes dans la solution protéique (Panyam et Kilara, 1996). Selon Panyam et Kilara (1996), les valeurs DH déterminées à l'aide de ces différentes méthodes ne sont pas toujours directement comparables.

1.5.5 Les traitements de désactivation et/ou d'élimination de l'enzyme en fin de réaction

Une fois la réaction d'hydrolyse complétée ou encore, le degré d'hydrolyse des protéines atteint, l'enzyme est désactivée ou retirée du milieu réactionnel afin de stopper la réaction. Le plus souvent, la désactivation de l'enzyme se fait par l'application d'un traitement thermique, dont les conditions sont choisies en fonction de la sensibilité de l'enzyme à la chaleur. En fait, il faut dénaturer l'enzyme de façon irréversible pour éviter que son action se poursuive après l'ajout de l'ingrédient hydrolysé dans un produit alimentaire. De façon générale, les températures de désactivation des enzymes se situent entre 70 et 90°C, et la durée des traitements varie de 3 à 30 minutes. Ces traitements sont donc très sévères et affectent également les propriétés finales de l'ingrédient, en particulier les produits faiblement hydrolysés et contenant une quantité importante de protéines intactes. Pour cette raison, certains fabricants optent plutôt pour la séparation physique de l'enzyme en fin de réaction et ce, afin de stopper la réaction enzymatique. Le plus souvent, cette séparation physique de l'enzyme est obtenue par ultrafiltration du milieu réactionnel.

La séparation des hydrolysats protéiques en fin de réaction enzymatique est basée sur la taille moléculaire différente des composantes. En effet, les protéines intactes et l'enzyme présentent un poids moléculaire beaucoup plus élevé (>20000 Da) que les peptides (10000-500 Da) et les acides aminés (<500 Da) libérés lors de la réaction d'hydrolyse. Il est donc possible d'isoler ces deux fractions par des techniques de filtration, où le seuil de coupure des membranes utilisées est le critère à sélectionner. Le choix de ce critère se fait alors en fonction de la composition en peptides recherchée pour une application particulière, mais également en considérant le rendement et l'efficacité des membranes filtrantes. De façon générale, des membranes d'ultrafiltration sont utilisées pour la séparation de l'enzyme et des protéines intactes en fin de réaction, alors qu'une étape de nanofiltration est quelquefois ajoutée au procédé de fabrication pour le dessalage des hydrolysats destinés à des applications particulières.

1.5.6 Les méthodes d'évaluation de la qualité des hydrolysats protéiques

À la base, la qualité des hydrolysats protéiques s'évalue par des critères comparables à ceux utilisés pour les ingrédients protéiques en général: teneur en protéines, glucides, lipides, cendres et minéraux, de même que la qualité microbiologique du produit et quelquefois des informations concernant la solubilité et la dispersibilité des poudres. Dans le cas des ingrédients protéiques hydrolysés, la détermination du degré d'hydrolyse (DH) ou d'un indice comparable est le premier critère qui se rajoute à la liste des informations permettant d'évaluer la qualité du produit. De plus, selon l'application recherchée pour un hydrolysat protéique, des données supplémentaires sont exigées par les utilisateurs de ces ingrédients. Par exemple, les hydrolysats utilisés à titre d'ingrédients fonctionnels nécessitent habituellement des analyses afin d'évaluer certaines de leurs propriétés fonctionnelles. Dans le cas des hydrolysats destinés à des applications nutritionnelles, des informations supplémentaires concernant la composition en acides aminés de l'ingrédient, le profil de poids moléculaire de ses composantes peptidiques et de sa teneur en protéines intactes, sont nécessaires.

1.5.7 Effet de l'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines

L'hydrolyse des liens peptidiques d'une protéine conduit à des changements importants de la fonctionnalité initiale de la protéine (Blenford, 1994). De façon générale, la solubilité d'une protéine augmente en fonction de son degré d'hydrolyse, alors que la viscosité de la solution protéique diminue rapidement en début de réaction (Britten et al., 1994; Ziajka et al., 1994; Sanchez et al., 1997). Ces changements dans les propriétés d'hydratation des protéines facilitent donc leur incorporation à fortes concentrations dans certains aliments enrichis en protéines, entre autres dans les boissons. Les propriétés moussantes, émulsifiantes et gélifiantes des protéines sont également modifiées par l'hydrolyse enzymatique (Gauthier et al., 1993; Frøkjær, 1994; Ju et al., 1995; Castro et al., 1996). Pour ces propriétés, la fonctionnalité d'un hydrolysat protéique sera fonction de la protéine et de l'enzyme utilisées, et sera optimale pour un degré d'hydrolyse spécifique, généralement inférieur à 10%. D'autre part, une hydrolyse intense des protéines (DH>10%) pourra conduire à des problèmes de couleur et de saveur dont l'apparition d'amertume dans le produit (Mahmoud, 1994; Panyam et Kilara, 1996).

1.6. BUT, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Dans la revue de littérature, il a été démontré que le marché des nutraceutiques est en pleine croissance et qu'il existe un potentiel commercial pour la mise au point d'un jus d'orange fortifié à base de protéines de lactosérum hydrolysées. Le marché visé par ce type de boissons nutraceutiques est celui des sportifs, des adolescents en pleine croissance, des individus sous régime amaigrissant et des personnes âgées. Le succès commercial d'une telle boisson repose toutefois sur des exigences réglementaires (cote protéique minimale), organoleptiques (goût, couleur, odeur) et physico-chimiques (solubilité, viscosité, turbidité, résistance aux traitements thermiques).

Enfin, il a été démontré que les protéines de lactosérum subissent une perte de solubilité suite à leur traitement thermique (pasteurisation, stérilisation) sous conditions acides, mais que l'hydrolyse enzymatique des protéines de lactosérum permet d'augmenter leur solubilité et leur stabilité thermique. En fait, le seul désavantage de l'hydrolyse enzymatique serait la possibilité de produire des peptides amers.

Le but du présent projet était donc la mise au point d'un hydrolysats enzymatique de protéines de lactosérum pour la fortification protéique d'un jus d'orange et ce, en vue de la fabrication d'une boisson « nutraceutique ». Par conséquent, en plus de la valeur nutritive initiale des protéines de lactosérum, les conditions d'hydrolyse enzymatique des protéines de lactosérum ont été ajustées de manière à produire une quantité importante (>50%) de peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da), lesquels sont reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme.

L'hypothèse à la base de ce travail a donc été formulée ainsi:

L'ajustement des conditions d'hydrolyse enzymatique d'un isolat de protéines de lactosérum permettra d'obtenir un ingrédient protéique riche (>50%) en peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da) et demeurant soluble suite à son addition à forte concentration (cote protéique de 20) dans un jus d'orange et à l'application d'un traitement thermique sévère (>95 °C, >5 min.).

Pour rencontrer ces exigences et atteindre la but de ce travail, les objectifs suivants ont été définis:

- 1) Sélectionner les conditions d'hydrolyse enzymatique (protéase, pH, activateur, durée d'hydrolyse) des protéines de lactosérum permettant l'obtention d'un mélange riche en peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da).
- 2) Identifier les conditions optimales de préparation, à l'échelle pilote, d'un hydrolysats enzymatique de protéines de lactosérum et procéder à la caractérisation complète de cet ingrédient protéique hydrolysé.
- 3) Évaluer les caractéristiques physico-chimiques (turbidité, solubilité, viscosité) de jus d'orange additionnés de protéines de lactosérum, sous forme native et hydrolysées et ce, selon quatre cotes protéiques (16, 20, 24, 28).
- 4) Mesurer la solubilité dans le jus d'orange des protéines de lactosérum natives et hydrolysées suivant l'application d'un traitement thermique.

La prochaine section de la thèse (chapitre 2) a été rédigée sous forme d'un article scientifique afin d'accélérer la publication des travaux de recherche. Cette section présente l'ensemble des expérimentations réalisées et des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de recherche. À noter que les références citées dans ce chapitre sont regroupées à la fin de la thèse, dans la section «Références bibliographiques». La thèse se termine enfin par la présentation d'une conclusion générale qui fait un retour sur les principaux résultats de la recherche et qui propose des voies futures pour l'atteinte des objectifs.

CHAPITRE 2

MISE AU POINT D'UN HYDROLYSAT ENZYMATIQUE DE PROTÉINES DE LACTOSÉRUM POUR LA FORTIFICATION PROTÉIQUE D'UN JUS D'ORANGE

2.1 RÉSUMÉ

Cette étude avait pour but la mise au point des conditions d'hydrolyse enzymatique des protéines de lactosérum en vue de la fabrication d'un ingrédient protéique destiné à la fortification d'un jus d'orange. Les conditions d'hydrolyse de ces protéines ont été ajustées en visant les deux critères suivants: 1) la production d'une grande quantité (>50%) de peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da), reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme; 2) l'amélioration de la solubilité de ces protéines dans un jus d'orange suite à l'application d'un traitement thermique sévère (100°C, 7 min). Il a été démontré que l'utilisation des enzymes alcalase et enzeco[®] bacterial protease II permet d'obtenir des ingrédients protéiques hydrolysés dont la teneur en peptides de faible poids moléculaire est de 93% et 55%, respectivement. Les caractéristiques de solubilité et de valeur nutritionnelle de ces deux hydrolysats protéiques sont également bien adaptées à la fortification protéique d'un jus d'orange. En effet, ces ingrédients contiennent une teneur élevée en protéines (>87%) de bonne qualité nutritive (CEP ~3.2), une faible teneur (<1%) en lactose et en matière grasse, de même qu'un contenu acceptable en sodium (~7 mg/g). D'autre part, additionnés à un jus d'orange selon une cote protéique de 20, les hydrolysats protéiques présentent une solubilité supérieure à 70% suivant l'application d'un traitement thermique sévère (100°C, 7 min), alors que la solubilité des protéines de lactosérum non-hydrolysées est de 35% dans les mêmes conditions. Enfin, bien que l'hydrolysat préparé à partir de l'enzyme enzeco[®] bacterial protease II présente une saveur plutôt neutre, celui obtenu à l'aide de l'alcalase possède une amertume prononcée pouvant limiter son utilisation.

2.2 INTRODUCTION

Les nutraceutiques sont des aliments ou des ingrédients qui offrent des vertus thérapeutiques et des bénéfices pour la santé des individus. Ces produits présentent l'image d'une vie meilleure et suscitent donc un intérêt marqué chez les consommateurs (Hilliam, 1995; Le Toullec, 1995; Paquin et Gauthier, 1995; Pitts, 1995; Ohr, 1997). Actuellement, le type de nutraceutique le plus répandu est la boisson non alcoolisée qui représente plus de 50 pourcent du marché japonais (Paquin et Gauthier, 1995). Dans ces boissons, une gamme variée de composantes nutraceutiques sont ajoutées telles des minéraux, des vitamines, des protéines, des fibres, etc. (Sfiligoj, 1994; Paquin et Gauthier, 1995; Toursel, 1998). Pour l'industrie laitière, la fortification protéique des boissons non alcoolisées représente donc une voie de valorisation intéressante pour le lactosérum de fromagerie.

Jusqu'à présent, le lactosérum a été exploité à des fins nutritives dans les boissons alcoolisées comme la bière ou le vin, ainsi que dans les boissons sans alcool (gazeuses ou non) comme les jus aromatisés ou les boissons aux fruits (Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992). Dans ces boissons, le lactosérum est ajouté sous différentes formes selon les traitements appliqués au produit: lactosérum brute, déprotéiné ou déminéralisé, concentrés de protéines ou ingrédient hydrolysé (Jelen et al., 1987; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992). Toutefois, en raison de l'insolubilité des protéines de lactosérum, surtout lors des traitements thermiques, l'addition de concentrés de protéines de lactosérum dans des boissons à des concentrations supérieures à 3% mène à la formation de précipités dans le produit (de Wit, 1989b). Au Canada, pour la préparation d'un jus (175 ml) fortifié en protéines, il faut atteindre une cote protéique de 20, ce qui représente 7g de protéines de bonne qualité (CEP=3.2) et ce, en autant que la teneur en protéines de l'ingrédient soit supérieur à 90%. Avec une quantité aussi importante de protéines (~4%) dans un jus, des problèmes de solubilité des protéines de lactosérum sont donc à prévoir. La solubilisation des protéines de lactosérum à de telles concentrations, surtout après un traitement de pasteurisation du jus, présente donc un défi important.

Pour contourner ce problème de solubilité, il est possible d'envisager un traitement d'hydrolyse enzymatique des protéines (Blenford, 1994). En effet, il a été démontré que l'hydrolyse enzymatique des protéines de lactosérum augmente leur solubilité (Britten, et al., 1994; Ziajka et al., 1994). Ce type de traitement permet aussi d'améliorer la digestibilité des protéines via la libération de peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da), lesquels sont reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme. Par contre, l'hydrolyse enzymatique des protéines peut mener à l'apparition d'amertume dans l'ingrédient hydrolysé, ce problème pouvant être résolu par un contrôle des conditions d'hydrolyse et/ou par l'utilisation d'exopeptidases spécifiques à la dégradation des peptides amers (Lahl et Braun, 1994).

Le but de la présente étude visait donc la mise au point d'un hydrolysats enzymatique de protéines de lactosérum pour la fortification protéique d'un jus d'orange et ce, en vue de la préparation d'une boisson nutraceutique. Pour ce type d'application, l'hydrolysats enzymatique devait donc répondre à certaines exigences en terme de solubilité et de turbidité à pH acide, de stabilité lors de traitements thermiques, mais également en terme de réduction de la taille des molécules protéiques afin de faciliter leur absorption par l'organisme. L'ensemble du travail a été défini de manière à rencontrer ces exigences, mais également dans un souci de mise à l'échelle industrielle du procédé de fabrication de l'hydrolysats enzymatique.

2.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.3.1 Matériel

L'isolat de protéines de lactosérum (BIPRO[®]) a été obtenu de la compagnie Davisco Foods International Inc. (Le Sueur, MN, USA). L'alcalase 2.4 L, isolée du *Bacillus licheniformis*, ainsi que la chymotrypsine 800S oral grade, isolée du pancréas porcin, provenaient de la compagnie Novo Nordisk (Copenhague, Danemark), alors que l'enzeco[®] bacterial protease II, isolée du *Bacillus subtilis*, a été obtenue de la compagnie EDC (New York, NY, USA). La sérum albumine bovine (67 000 Da), l'ovalbumine (43 000 Da), le chymotrypsinogène A (25 000 Da) ainsi que la ribonucléase A (13 700 Da) ont été obtenus de la compagnie Pharmacia (Bromma, Suède). L'hémoglobine, l'IgG bovine (150 000 Da), le N-formyl-méthionine-alanine (248 Da), l' α -lactalbumine (14 000 Da), l'insuline A (2 531 Da) et le kentsin (500 Da) provenaient de la compagnie Sigma Chemicals Co. (St-Louis, MO, USA). Les hydroxydes de sodium et de potassium de grade alimentaire ont été obtenus des Laboratoires MAT (Québec, Qc, Canada). L'acide citrique, le sucre inverti et la pectine (Genu Pectin-vis) étaient de grade alimentaire et provenaient des Aliments UFL Inc. (Boucherville, Qc, Canada), de Nealanders International Inc. (Etobicoke, Ont., Canada) et de Hercules Inc. (Wilmington, DE, USA), respectivement. Le jus d'orange sans pulpe de marque Oasis (Lassonde Inc., Rougemont, Qc, Canada) a été acheté dans un supermarché. Tous les autres produits utilisés dans le cadre de cette étude étaient de grade analytique.

2.3.2 Dosage de l'activité enzymatique spécifique des enzymes

L'activité enzymatique spécifique (unités/mg protéine) de l'alcalase, la chymotrypsine et l'enzeco[®] bacterial protease II a été évalué à 673.6 U, 1916.8 U et 70.4 U, respectivement; cette activité a été mesurée selon une modification de la méthode de Anson et Mirsky (1932). Avec cette méthode, une unité (U) d'enzyme correspond à une variation de 0,001 de la densité

optique à 280 nm, par minute, par mg de protéine; la teneur en protéines des préparations enzymatiques a été déterminée par la méthode Kjeldahl (FIL, 1993).

Une solution d'hémoglobine est préparée dans un tampon TRIS 0,2M (pH 7,4) additionné de 0,01M CaCl₂; la concentration en hémoglobine de cette solution était de 2,5% (p/v) pour l'enzeco[®] bacterial protease II et de 3,5% (p/v) pour la chymotrypsine et l'alcalase. Dans des tubes maintenus à 37°C, 5 ml de la solution d'hémoglobine sont ajoutés, suivi de l'addition de 1 ml de la solution enzymatique; cette solution est préparée dans l'eau déionisée à des concentrations variant de 0,1% à 0,5% (p/v) pour l'enzeco[®] bacterial protease II et de 0,0063% à 0,1% (p/v) pour la chymotrypsine. Dans le cas de l'alcalase, déjà à l'état liquide, différents volumes (0.19, 0.25, 0.38, 0.50 et 0.75µl) de préparation enzymatique sont ajoutés à la solution d'hémoglobine. Après 5 minutes exactement, 10 ml d'une solution TCA (10% p/v) sont additionnés aux tubes pour stopper la réaction enzymatique. Un blanc est également préparé en ajoutant 1 ml de chacune des solutions enzymatiques à des tubes contenant déjà 5 ml de la solution d'hémoglobine et 10 ml de la solution de TCA. Les tubes sont alors agités et les solutions sont filtrés sur Whatman #1. L'absorbance des filtrats est mesurée à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre 8451A Diode Array de Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA).

2.3.3 Mise au point des conditions d'hydrolyse enzymatique

Sélection des protéases

L'hydrolyse enzymatique du BIPRO[®] (94,4% protéines) a été réalisée à l'aide de l'alcalase, la chymotrypsine et l'enzeco[®] bacterial protease II. Ces hydrolyses ont été réalisées dans un bioréacteur (Bio-Expert, Qc) d'une capacité de 7L, muni d'un contrôle automatique de la température (paroi chauffante), de l'agitation (agitateur à palmes) et du pH. Pour chaque hydrolyse, 5 litres d'une solution de BIPRO[®] (20% ST, p/p) sont préparés dans l'eau distillée. La température et le pH du mélange sont alors ajustés aux conditions d'activité optimale indiquées sur les fiches techniques des trois enzymes soient: 42°C, pH 7,0 dans le cas de l'alcalase, 42°C, pH 8,0 pour la chymotrypsine et 45°C, pH 8,0 pour l'enzeco[®] bacterial

protease II. L'ajout de 0,01M de chlorure de calcium (CaCl_2) comme activateur a été fait dans le cas de la chymotrypsine et de l'enzeco[®] bacterial protease II.

Une fois la température et le pH stabilisés, la réaction d'hydrolyse est initiée par l'ajout des enzymes selon un ratio E:S (g enzyme:g protéine) de 1:200 et 1:25 pour la chymotrypsine et l'enzeco[®] bacterial protease II, respectivement. Ces enzymes sont ajoutées au mélange réactionnel après leur solubilisation dans du HCl 0,001N (10% p/p). Dans le cas de l'alcalase, déjà à l'état liquide, 100 ml de la préparation enzymatique sont ajoutés au milieu correspondant à un ratio E:S (ml enzyme:g protéine) de 1:9,4. Le ratio E:S des enzymes a été déterminé à partir de leur activité enzymatique spécifique, préalablement mesurée (section 2.2).

En cours d'hydrolyse, le pH a été maintenu constant par l'ajout de NaOH (2N) et les réactions ont été poursuivies pendant 120 minutes; le degré d'hydrolyse des protéines (DH) a été calculé à partir de la consommation de base, selon la méthode pH-Stat décrite par Adler-Nissen (1977). En fin de réaction, un échantillon (150 ml) de mélange réactionnel est prélevé, dilué avec de l'eau distillée selon un ratio 1:2 (eau:hydrolysate), puis un traitement thermique d'inactivation de l'enzyme (75°C, 7 min.) est appliqué.

Les échantillons ont été séchés par atomisation à l'aide d'un appareil Niro bifluide co-courant (Minor Mobile Niro Atomizer, Copenhague, Danemark) muni d'une buse, avec une température de l'air à l'entrée et à la sortie de 195°C et 85°C, respectivement. Les poudres recueillies ont été analysées par HPSEC afin de déterminer le profil de poids moléculaire de leur composantes protéiques.

Effet du pH et de la présence de calcium sur l'activité enzymatique

Pour cette étude, l'activité enzymatique de l'alcalase et l'enzeco[®] bacterial protease II a été évaluée à deux valeurs de pH (7,0 et 8,0), avec et sans l'ajout de calcium dans le milieu réactionnel. Les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées dans des béchers de 1L, avec

contrôle de la température (bain-marie) et de l'agitation (agitateur à pales). Pour chaque essai, 600ml d'une solution de BIPRO[®] (20% ST, p/p, 94,4% protéine) sont préparés dans l'eau distillée; lorsque requis, 0,01M de chlorure de calcium est ajouté à la solution protéique. La température de la solution est augmentée à 45°C et selon l'étude, le pH a été ajusté à 7,0 ou 8,0 à l'aide de NaOH 1N. Une fois la température et le pH stabilisés, la solution enzymatique est ajoutée pour initier la réaction d'hydrolyse. Dans le cas de l'enzyme enzeco[®] bacterial protease II, 75,5 ml d'une solution enzymatique à 6% (p/v, dans HCl 0,001N) sont ajoutés au mélange réactionnel, correspondant à un ratio enzyme:substrat de 1:25 (g enzyme:g protéine). Pour l'alcalase, déjà à l'état liquide, 12 ml de la préparation enzymatique sont ajoutés à la solution protéique selon un ratio E:S de 1:10 (ml enzyme:g protéine). En cours d'hydrolyse, le pH a été maintenu à la valeur initiale (7,0 ou 8,0) par l'ajout manuel de base (NaOH 1N) et le degré d'hydrolyse (DH) des protéines a été calculé à partir de la consommation de base selon la méthode pH-Stat décrite par Adler-Nissen (1977). Pour les deux enzymes, la réaction a été poursuivie jusqu'à 60 minutes.

Effet du contrôle du pH en cours d'hydrolyse sur l'activité enzymatique et la composition minérale de l'hydrolysats

Pour cette étude, l'activité enzymatique de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II a été comparée pour des hydrolyses réalisées avec un contrôle du pH (méthode pH-Stat) ou encore, avec un contrôle partiel du pH (combinaison des méthodes pH-Stat et osmométrie). Les hydrolyses enzymatiques du BIPRO[®] (91,5% protéine) ont été réalisées dans un bioréacteur (Bio-Expert, Qc) d'une capacité de 7L, muni d'un contrôle automatique de la température (paroi chauffante), de l'agitation (agitateur à palmes) et du pH. Pour chaque essai, 4 litres d'une solution de BIPRO[®] (20% ST, p/p) sont préparés dans l'eau distillée; la température du mélange est augmentée à 45°C et le pH est ajusté à 8,0 à l'aide de NaOH 2N. Une fois la température et le pH stabilisés, 250 ml d'une solution enzymatique d'enzeco[®] bacterial protease II (11,7% p/v, dans HCl 0,001N, ratio E:S de 1:25) sont ajoutés au mélange réactionnel pour initier la réaction d'hydrolyse. Dans le cas de l'alcalase, 73,2 ml de la préparation enzymatique liquide (ratio E:S de 1:10) sont ajoutés au milieu.

Les hydrolyses enzymatiques réalisées avec contrôle du pH ont été suivies par la méthode pH-Stat (Adler-Nissen, 1976), i.e. avec l'ajout de NaOH 2N afin de maintenir constant le pH initial (8,0) de la réaction. Ces hydrolyses ont été poursuivies jusqu'à 75 et 120 minutes pour les enzymes alcalase et enzeco[®] bacterial protease II, respectivement. Dans le cas des hydrolyses enzymatiques réalisées avec un contrôle partiel du pH, la réaction a été suivie par la méthode pH-Stat jusqu'à un degré d'hydrolyse de 4%, puis l'ajout de base a été stoppé et la cinétique d'hydrolyse a été mesurée par osmométrie jusqu'à la fin de la réaction à l'aide d'un appareil Advanced Instruments Inc. (modèle 3300, MA, USA). Pour ces hydrolyses, la réaction a été poursuivie jusqu'à 75 et 150 minutes pour les enzymes alcalase et enzeco[®] bacterial protease II, respectivement.

En fin de réaction, un échantillon (200 ml) de mélange réactionnel a été prélevé, dilué dans l'eau distillée selon un ratio 1:2 (eau:hydrolysate), puis un traitement thermique d'inactivation de l'enzyme (70°C, 20 min.) a été appliqué. Les échantillons ont été congelés, puis lyophilisés. Les poudres recueillies ont été analysées pour leur teneur en protéine par la méthode Kjeldahl, leur degré d'hydrolyse par la méthode AN/TN, leur teneur en minéraux par électrophorèse capillaire et le profil de poids moléculaire des composantes protéiques par HPSEC.

Mise au point des conditions de désactivation des enzymes en fin de réaction

Cette étude a été réalisée afin de déterminer les conditions (pH, T°, durée) du traitement thermique assurant l'inactivation des enzymes alcalase et enzeco[®] bacterial protease II en fin de réaction. Les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées dans un bioréacteur (New Brunswick Scientific, NJ, USA) d'une capacité de 600ml, muni d'un contrôle automatique de la température et de l'agitation (barreau magnétique). Pour chaque essai, 400ml d'une solution de BIPRO[®] (20%ST, p/p, 91,5% protéine) sont préparés dans l'eau distillée. La température de la solution est augmentée à 45°C et le mélange est ajusté à pH 6,5 à l'aide d'une solution d'acide citrique (25%). Une fois la température et le pH stabilisés, 25 ml d'une solution d'enzeco[®] bacterial protease II (11,7% p/v, dans HCl 0,001N, ratio E:S de 1:25) sont ajoutés au mélange réactionnel alors que dans le cas de l'alcalase, 7,3 ml de préparation enzymatique

liquide (ratio E:S de 1:10) sont ajoutés pour initier la réaction d'hydrolyse. En cours d'hydrolyse, le pH (6,5) du milieu réactionnel est maintenu constant par l'addition manuel de NaOH 1N. Après 30 minutes de réaction, le mélange réactionnel est dilué dans l'eau distillée selon un ratio 1:2 (eau:hydrolysats). L'inactivation thermique de l'enzyme est alors réalisée dans une des conditions suivantes: 85°C/5 min, 75°C /10 min, 65°C /15 min ou 55°C /20 min. La solution protéique désactivée est ensuite séparée en deux volumes égaux (300 ml). Une portion du mélange est rapidement refroidie (après hydrolyse) alors que la deuxième portion est ajustée au pH initial de la réaction (6,5), puis placée à nouveau dans le bioréacteur à 45°C pour une durée additionnelle de 60 minutes (après désactivation). Les deux portions de mélange réactionnel (après hydrolyse et après agitation) ont ensuite été congelées, puis lyophilisées. Les poudres obtenues ont été analysées pour leur degré d'hydrolyse par la méthode AN/TN.

2.3.4 Préparation finale des hydrolysats enzymatiques

L'hydrolyse enzymatique du BIPRO[®] (93,3% protéine) a été réalisée dans un fermenteur (New Brunswick, Edison, NJ, USA) d'une capacité de 15L, muni d'un contrôle automatique de la température (bain-marie) et de l'agitation (agitateur à palmes). Pour chaque essai, 14 litres d'une solution de BIPRO[®] (20% ST, p/p) sont préparés dans l'eau distillée; la température du mélange est augmentée à 45°C et le pH est ajusté à 8,0 à l'aide d'un mélange NaOH/KOH 2N (ratio 1:2) de grade alimentaire. Une fois la température et le pH stabilisés, 893 ml d'une solution enzymatique d'enzeco[®] bacterial protease II (11,7% p/v, dans HCl 0,001N, ratio E:S de 1:25) sont ajoutés au mélange réactionnel pour initier la réaction d'hydrolyse. Dans le cas de l'alcalase, 261 ml de la préparation enzymatique liquide (ratio E:S de 1:10) sont ajoutés au milieu.

Les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées avec un contrôle partiel du pH, c'est-à-dire que la réaction a été suivie par la méthode pH-Stat jusqu'à un degré d'hydrolyse de 4%, puis l'ajout de base a été stoppé et la cinétique d'hydrolyse a été mesurée par osmométrie jusqu'à la fin de la réaction à l'aide d'un appareil Advanced Instruments Inc. (modèle 3300, MA, USA). Pour

ces hydrolyses, la réaction a été poursuivie jusqu'à 75 et 150 minutes pour les enzymes alcalase et enzeco[®] bacterial protease II, respectivement.

En fin de réaction, l'hydrolysate a été dilué dans l'eau distillée selon un ratio 1:2 (eau:hydrolysate), puis un traitement thermique d'inactivation de l'enzyme a été appliqué dans les conditions préalablement déterminées (section 2.3.4): 65°C/15 minutes dans le cas de l'alcalase et 75°C/10 minutes pour l'enzeco[®] bacterial protease II. Les échantillons désactivés ont été congelés, puis lyophilisés. La composition chimique des poudres a été déterminée de même que leur degré d'hydrolyse par la méthode AN/TN et le profil de poids moléculaire des composantes protéiques par HPSEC.

2.3.5 Évaluation des caractéristiques physico-chimiques des ingrédients protéiques

Mesure de la solubilité des ingrédients protéiques

La solubilité du Bipro[®] et des hydrolysats protéiques a été déterminée en milieu aqueux à pH 7.0 par la méthode NSI standard (AOCS, 1985), de même que dans une solution modèle et dans un jus d'orange suivant des modifications apportées à cette méthode. La méthode NSI standard consiste à solubiliser les protéines dans l'eau distillée (1%) ajustée à pH 7,0. Les solutions sont agitées pendant 120 minutes, puis un échantillon (NT) est prélevé pour déterminer l'azote totale. Ensuite, la solution est centrifugée (10 min., 22°C, 3000g), filtrée (Whatman #1), puis un échantillon (NS) est prélevé dans le filtrat. La teneur en azote est alors déterminée par la méthode Kjeldahl sur les échantillons NT et NS et la valeur NSI est calculée à partir de l'équation suivante:

$$\text{Indice de solubilité de l'azote (\%)} = \frac{\text{NS}}{\text{NT}} * 100$$

Pour la méthode NSI modifiée, les échantillons ont été solubilisés dans la solution modèle et dans le jus d'orange, mais sans ajustement du pH à 7.0. Par la suite, ils ont été traités comme décrit pour la méthode NSI standard.

Mesure de la turbidité des ingrédients protéiques en solution modèle

La turbidité du Bipro[®] et des hydrolysats protéiques a été mesurée dans une solution modèle, reproduisant les conditions physico-chimiques d'un jus d'orange. Cette solution modèle a été préparée dans l'eau distillée additionnée de 9.2% de sucre inverti, 4.8% de solution de pectine (2% p/v) et 0.5% d'acide citrique (50% p/v). Par la suite, le Bipro[®] et les hydrolysats protéiques ont été ajoutés à la solution modèle selon quatre cotes protéiques: 16, 20, 24 et 28. La cote protéique se définit comme le Coefficient d'Efficacité Protéique (CEP) de la protéine multiplié par la quantité de protéines (g) ajoutée à une portion de jus de 175 ml. Pour ce calcul, une valeur de CEP moyen de 3.2 a été utilisée pour les protéines de lactosérum (O'Carroll, 1998).

La turbidité des solutions a été déterminée après leur agitation pendant 20 minutes, à une longueur d'onde de 610 nm à l'aide d'un spectrophotomètre 8451A Diode Array de Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA).

Mesure de la viscosité de la solution modèle et du jus d'orange additionné des ingrédients protéiques

La solution modèle décrite précédemment et le jus d'orange ont été additionnés de Bipro[®] et des hydrolysats protéiques selon les quatre cotes protéiques sélectionnées (16, 20, 24 et 28). Les solutions protéiques ont été agitées pendant 20 minutes et la viscosité a été déterminée à l'aide d'un viscosimètre Brookfield model DV-II+ (Stoughton, MA, USA) muni d'une tige LV4, selon une vitesse de rotation de 100 RPM.

Stabilité thermique des ingrédients protéiques dans la solution modèle et le jus d'orange

Pour évaluer la stabilité thermique des ingrédients protéiques, 250 ml de solution modèle et de jus d'orange ont été additionnés de Bipro[®] et des hydrolysats protéiques selon les quatre cotes protéiques sélectionnées (16, 20, 24 et 28). Ces solutions ont été placées dans des bouteilles

de verre, lesquelles ont ensuite été immergées dans l'eau bouillante pendant 7 minutes. Par la suite, l'indice de solubilité de l'azote (NSI) a été déterminée de manière à évaluer la perte de solubilité des ingrédients protéiques dans la solution modèle et dans le jus d'orange.

2.3.6 Méthodes analytiques

Détermination du degré d'hydrolyse des protéines par la méthode pH-Stat

La méthode pH-Stat, telle que proposée par Adler-Nissen (1977), permet de déterminer le degré d'hydrolyse (DH) des protéines à partir de la quantité de base nécessaire pour neutraliser les protons libérés lors de l'hydrolyse des liens peptiques d'une protéine. Cette quantité de base est ensuite utilisée pour calculer le degré d'hydrolyse des protéines à l'aide de l'équation suivante:

$$DH (\%) = \frac{B * N_b * 1 / \alpha * 1 / MP}{h_{tot}} * 100$$

où: B est la consommation de base (ml); N_b est la normalité de la base; $1 / \alpha$ est une constante égale à 1.2; MP est la quantité de protéines dans le milieu (g); h_{tot} est le nombre total de liens peptidiques dans le substrat, qui dans le cas des protéines de lactosérum, est égal à 8 meq/Kg de protéines.

Détermination du degré d'hydrolyse des protéines par osmométrie

L'osmométrie est basée sur la relation existant entre la baisse du point de congélation d'une solution et le nombre de molécules en solution. Cette méthode peut donc être utilisée pour déterminer le degré d'hydrolyse des protéines puisque que l'hydrolyse des liens peptiques d'une protéine conduit à la libération d'un nombre plus important de molécules en cours de réaction, qui se traduit alors par une baisse du point de congélation de la solution. Cette baisse du point de congélation est alors utilisée pour le calcul du degré d'hydrolyse à partir de l'équation suivante:

$$DH (\%) = \frac{\Delta C \cdot 1 / \omega \cdot 1 / h_{tot}}{P} \cdot 100$$

où: ΔC est la baisse du point de congélation (mosm); P est la concentration en protéines de la solution (g/L); $1 / \omega$ est un facteur de calibration de l'osmomètre et est égal à 1,04; h_{tot} est le nombre total de liens peptidiques dans le substrat, qui dans le cas des protéines de lactosérum, est égal à 8 meq/Kg de protéines.

Détermination du ratio AN/TN

Le degré d'hydrolyse des protéines peut également être estimé par la mesure du ratio AN/TN, défini comme la teneur d'un échantillon en azote α -aminé (AN), divisé par sa teneur en azote total (TN). Avec cette méthode, le contenu en azote total de l'échantillon est déterminé par la méthode Kjeldahl, alors que sa teneur en azote α -aminé est mesurée par une titration au formol réalisée dans les conditions suivantes: 25 ml d'une solution protéique (5% ST, p/p) sont préparés dans l'eau distillée et placés sous agitation; la solution est ajustée à pH 7,0 à l'aide de NaOH 0,1N, puis 10 ml d'une solution de formaldéhyde (pH 9,0) sont ajoutés au mélange. Cette solution est alors titrée à pH 9,0 à l'aide de NaOH 0,1N, et la quantité de base (NaOH 0,1N) nécessaire à l'ajustement du pH est utilisée pour le calcul du ratio AN/TN selon l'équation suivante:

$$\frac{AN}{TN} (\%) = \frac{ml \text{ NaOH } 0.1N \cdot 1.4 \text{ mg N } \alpha\text{-aminé ml}^{-1}}{mg \text{ N dans l'échantillon}}$$

Analyse du profil de poids moléculaire des composantes protéiques par HPSEC

L'analyse HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) a été réalisée à l'aide d'une chaîne chromatographique Beckman System Gold® (Mississauga, Canada) muni d'un système de pompe (modèle 126P), d'un détecteur UV/visible à longueur d'ondes variables (modèle 166P) ajustée à 214 nm, d'un injecteur manuel Rheodyne (modèle 7725i, Cotati, CA, USA) et d'une boucle d'injection Rheodyne de 20 μ l (Cotati, CA, USA). L'acquisition et le

traitement des données ont été obtenus à l'aide du logiciel Gold® Nouveau de Beckman (Mississauga, Canada). Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une pré-colonne BIOSEP S2000 GRD (7,8 x 75mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) et d'une colonne BIOSEP SEC-S2000 (7,8 x 300mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) maintenues à une température de 30°C. Le système a été équilibrée dans un tampon phosphate de sodium (0,1M; pH 6,8), puis 50µl d'une solution d'échantillons (0,8% protéine, p/v) ont été injectés sur la colonne. L'élution a été obtenue en mode isocratique avec un débit de 1 ml/min. La phase mobile et les échantillons ont été préalablement filtrés sur une membrane de 0,22µm (PVDF, Gelman). Les standards protéiques utilisés pour la calibration de la méthode étaient les suivants: la sérum albumine bovine (67000 Da), l'ovalbumine (43000 Da), le chymotrypsinogène A (25000 Da), la ribonucléase A (13700 Da), l'IgG bovine (150000 Da), le N-formyl-méthionine-alanine (248 Da), l'α-lactalbumine (14000 Da), l'insuline A (2531 Da) ainsi que le kentsin (500 Da). Pour chaque échantillon, les chromatogrammes ont été séparés en quatre zones de poids moléculaire différents: >10000, 5000-10000, 2000-5000 et <2000 Da. La proportion (%) de peptides élués dans chacune de ces zones a été calculée en divisant la surface de la zone par la surface totale du chromatogramme.

Analyse des anions et des cations par électrophorèse capillaire

L'analyse des anions et des cations a été réalisée par électrophorèse capillaire à l'aide d'un appareil Hewlett-Packard modèle ^{3D}CE, contrôlé à l'aide du logiciel HPChemStation software. Pour les deux analyses, un capillaire (50 µm x 72 cm) en silice fondue a été utilisé et l'injection a été faite en mode hydrodynamique à une pression de 50 mbar pendant 4 secondes. La détection des anions et des cations a été obtenue à 350 et 340 nm, respectivement. Pour le dosage des anions, le tampon était composé d'acide pyromellitique, d'hydroxyde de sodium, d'hydroxyde d'hexamethonium et de triethanolamine (Dionex, Sunnyvale, CA). Dans le cas des cations, un tampon à base de sulfate de cuivre, d'eau 18MΩ et d'acide formique a été utilisé. Les analyses ont été réalisées à partir de solutions d'échantillons (4%, p/v) préparées dans de l'eau 18MΩ, qui ont été filtrées sur une membrane de PDF (0,2 µm) avant leur injection dans le capillaire.

Analyses chimiques

La teneur en matière grasse du Bipro® et des hydrolysats protéiques a été déterminée en duplicata par la méthode mojonier (AOAC, 1990a), alors que la teneur en protéines a été évaluée en duplicata par la méthode Kjeldahl (FIL, 1993). Le contenu en lactose des échantillons a été déterminé en duplicata à l'aide du kit enzymatique Lactose/D-Glucose de la compagnie Boehringer Mannheim (Mannheim, Allemagne) (FIL, 1989). Les solides totaux et le contenu en cendres des échantillons ont été déterminés en duplicata selon la méthode de l'AOAC (1990b). Pour ces analyses, les échantillons protéiques ont été pesés dans des creusets et séchés dans un four à vide (100°C) pendant environ 5 heures. Les échantillons ont ensuite été refroidis dans un dessiccateur et pesés pour obtenir leur teneur en solides. Par la suite, ces échantillons ont été incinérés dans un four à cendres (550°C) pendant 24 heures, refroidis, puis deux millilitres d'acide nitrique (HNO₃) ont été ajoutés aux cendres. Après évaporation, les échantillons ont ensuite été calcinés de nouveau dans le four à cendre (550°C) pour 24 heures. Enfin, ils ont été refroidis puis pesés pour déterminer leur teneur en cendres.

2.4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Pour la préparation d'un hydrolysate enzymatique de protéines de lactosérum destiné à la fortification protéique d'un jus d'orange, le Bipro[®], un isolat de protéines de lactosérum, a été sélectionné comme substrat protéique. Les raisons de ce choix reposent sur la richesse en protéines de ce substrat, contenant plus de 92% de protéines, et sur sa teneur réduite (<1%) en matières grasses et en lactose. En fait, selon la réglementation canadienne, une appellation fortifiée en protéines est permise uniquement pour des jus dont la cote protéique est de 20, laquelle se définit comme le CEP multiplié par la quantité de protéines (g) ajoutée à une portion de jus de 175 ml. Pour les protéines de lactosérum dont le CEP est de 3.2, il faut donc ajouter 6.25g de protéines par 175 ml de jus. Avec un substrat riche en protéines comme le Bipro[®] (92% de protéines), ceci représente l'ajout de 6.8g de poudre. Par contre, si un substrat à plus faible teneur en protéine est ajouté, comme un CPL à 35% de protéines, il faudra alors ajouter 17.9g de poudre à 175 ml de jus. L'ajout dans un jus d'un ingrédient à faible teneur en protéines présente aussi le désavantage d'ajouter une quantité plus importante de composantes non désirables, comme la matière grasse et le lactose. Par exemple, pour un CPL 35% dont les teneurs en matières grasses et en lactose sont respectivement de 5% et 50% (Morr, 1989), l'ajout de 17.9g de poudre à 175 ml de jus mène à l'addition de 1g de gras et de 10g de lactose. Selon Sienkiewicz et Riedel (1990), la présence d'une grande quantité de lipides dans les boissons acides peut conduire à la coagulation des protéines sériques. D'autre part, pour ce type de boisson, il est préférable de limiter le contenu en lactose dont le pouvoir sucrant est faible, mais qui contribue à augmenter la valeur calorique du produit et qui cause des problèmes d'intolérance chez certains individus.

Une fois le substrat protéique sélectionné, il fallait déterminer les conditions d'hydrolyse enzymatique de ce substrat afin d'obtenir un hydrolysate protéique fortement hydrolysé et ce, de manière à améliorer la solubilité initiale du Bipro[®] surtout lors du traitement de pasteurisation du jus. Aussi, pour conférer un avantage nutritionnel à l'ingrédient hydrolysé, un contenu élevé en peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da) était visé, en raison de leur assimilation rapide par l'organisme. C'est donc en se basant sur ces critères que les conditions

d'hydrolyse enzymatique du Bipro[®] ont été sélectionnées, mais également dans un souci de mise à l'échelle industrielle du procédé d'hydrolyse enzymatique.

Le premier paramètre étudié pour la mise au point des conditions d'hydrolyse enzymatique du Bipro[®] a été le choix de l'enzyme pour effectuer la réaction d'hydrolyse. Trois protéases commerciales ont été comparées: l'alcalase 2.4L et la chymotrypsine 800S oral grade, toutes deux de la compagnie Novo Nordisk, et l'enzeco[®] bacterial protease II de la compagnie EDC. L'alcalase 2.4L est une endoprotéase de source bactérienne, isolée de *Bacillus licheniformis*, dont la spécificité se situe principalement au niveau des résidus Leu et Tyr. La chymotrypsine est aussi une endoprotéase, mais de source animale (pancréas de porc), laquelle est spécifique à l'hydrolyse des liens peptidiques du côté carboxyle des acides aminés suivants: Phe, Trp, Tyr, Leu, Met, His. Dans le cas de l'enzeco[®] bacterial protease II, il s'agit d'une endoprotéase isolée de *Bacillus subtilis* dont la spécificité n'est pas précisée sur la fiche technique de la compagnie, mais il semble que la spécificité de cette enzyme soit assez large.

Ces protéases ont été sélectionnées en raison de leur capacité à hydrolyser les protéines de lactosérum à pH neutre ou alcalin, région de solubilité maximale de ces protéines, et à température non dénaturante (35-45°C) pour ces protéines. Enfin, de manière à optimiser l'hydrolyse du Bipro[®] à l'aide de ces trois protéases, le ratio E:S de la réaction d'hydrolyse a été ajusté en fonction de l'activité enzymatique spécifique (unités/mg de protéines) de chaque enzyme, déterminée à l'aide d'une méthode utilisant les protéines de lactosérum comme substrat protéique. Avec cette méthode, l'activité enzymatique spécifique de l'alcalase, la chymotrypsine et l'enzeco[®] bacterial protease II a été évaluée à 674, 1917 et 70 unités respectivement.

La figure 2.1 illustre la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] à l'aide des trois protéases étudiées. Ces réactions ont été réalisées dans les conditions optimales de pH et de température de chacune des enzymes soient 42°C/pH 7.0 dans le cas de l'alcalase, 42°C/pH 8.0 pour la chymotrypsine et 45°C/pH 8.0 pour l'enzeco[®] bacterial protease II. Le ratio E:S de ces réactions ayant été ajusté en fonction de l'activité enzymatique spécifique des enzymes, on

observe une cinétique d'hydrolyse comparable pour les trois protéases. Le Bipro[®] est hydrolysé rapidement dans les 30 premières minutes de réaction, où une légère baisse de la vitesse réactionnelle est observée jusqu'à la fin de la réaction. Après 120 minutes, le degré d'hydrolyse (DH) des protéines est comparable pour les trois protéases et varie de 8.5 à 9.2%. Pour orienter le choix des protéases, les hydrolysats obtenus après 120 minutes de réaction ont été désactivés thermiquement (75°C/7 minutes), congelés et séchés par atomisation et ce, afin d'analyser le profil de poids moléculaire de leurs composantes protéiques par HPSEC. Les résultats de cette analyse sont présentés au tableau 2.1.

Le Bipro[®] est un substrat protéique de grande qualité contenant une très faible proportion (<1.5%) de composantes de faible poids moléculaire (<10000 Da). Suivant son hydrolyse à l'aide de l'alcalase et jusqu'à une valeur DH de ~8.5% (120 min, figure 2.1), on observe une dégradation quasi-complète des protéines de lactosérum (>10000 Da) en composantes de faible poids moléculaire, avec plus de 99% de peptides de taille inférieure à 5000 Da. Dans le cas de la chymotrypsine et de l'enzeco[®] bacterial protease II, les profils de poids moléculaire des composantes protéiques sont assez similaires, mais s'éloignent fortement du profil obtenu avec l'alcalase. En fait, il semble qu'une quantité importante de protéines intactes demeurent dans les hydrolysats obtenus avec la chymotrypsine (44.4%) et l'enzeco[®] bacterial protease II (36.4%) et ce, malgré des valeurs DH équivalentes (8.2 à 9.2%) obtenues pour les trois ingrédients hydrolysés. Comme conséquence, la teneur en peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da) ne dépasse pas 60% pour les hydrolysats obtenus à l'aide de la chymotrypsine et de l'enzeco[®] bacterial protease II. La spécificité de l'alcalase, combiné à la séquence primaire des protéines de lactosérum, permettrait donc à cette enzyme de libérer des peptides de plus petites tailles.

En raison de la forte teneur en peptides de petites tailles de l'hydrolysat obtenu à l'aide de l'alcalase, cette enzyme a été sélectionnée pour la poursuite des travaux. Dans le cas de la chymotrypsine et de l'enzeco[®] bacterial protease II, dont les profils de poids moléculaire sont comparables, le choix a été réalisé en considérant le coût de ces protéases pour l'hydrolyse de 1 Kg de protéines de lactosérum, mais en tenant compte également de leur activité

enzymatique spécifique différente, laquelle influence le ratio E:S utilisé pour obtenir la même cinétique d'hydrolyse. Dans le cas de la chymotrypsine, le coût en enzyme pour l'hydrolyse de 1 Kg de protéines s'élève à 15\$CA, alors que celui de l'enzeco[®] bacterial protease II est de 2.70\$CA. L'enzeco[®] bacterial protease II est donc une enzyme plus avantageuse en terme de coût pour la mise au point d'un procédé d'hydrolyse enzymatique à l'échelle industrielle, et pour la fabrication d'un ingrédient protéique hydrolysé; elle a donc été sélectionnée pour la poursuite des travaux.

Suite à la sélection des protéases, l'alcalase et l'enzeco[®] bacterial protease II, l'hydrolyse du Bipro[®] a été optimisée par une étude de l'effet du pH réactionnel et de la présence de calcium (activateur) dans le milieu réactionnel sur la cinétique d'hydrolyse. En fait, il existe un pH optimal propre à chaque enzyme, mais ce dernier peut varier selon le substrat protéique étant donné l'effet du pH sur la structure tridimensionnelle des protéines. Dans le cas des protéines de lactosérum, en particulier la β -lactoglobuline, on assiste effectivement à une modification de la structure de cette protéine entre pH 7.0 et 8.0 (de Wit, 1989a). En effet, la β -lactoglobuline se présente sous la forme de dimères au pH du lait (5.5-7.5), alors que ces derniers se dissocient graduellement à pH supérieur à 7.5. L'attaque enzymatique de la β -lactoglobuline peut donc varier considérablement sur une gamme restreinte de pH (7-8) et ce, malgré le pH optimal de l'enzyme.

Pour vérifier l'effet du pH sur la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II, des hydrolyses enzymatiques ont été réalisées pour une durée de 60 minutes et dans les conditions suivantes: solution protéique à 20% ST, 45°C, pH 7.0 ou pH 8.0, ratio E:S de 1:10 et 1:25 pour l'alcalase et l'enzeco[®] bacterial protease II respectivement. De plus, pour vérifier l'effet du calcium sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique, ces hydrolyses ont été réalisées avec ou sans la présence de 0.01 M de CaCl₂. Le calcium est non seulement un activateur de certaines enzymes (ex.: trypsine), mais il permet parfois de stabiliser certaines enzymes (ex.: chymotrypsine) en cours de procédé industriel (Colowick et Kaplan, 1970).

La figure 2.2 illustre l'effet du pH et de la présence du calcium sur la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II. Pour les deux enzymes, le pH réactionnel modifie de façon importante la cinétique d'hydrolyse des protéines de lactosérum. En effet, la valeur DH obtenue après 60 minutes de réaction à l'aide de l'alcalase (figure 2.2A) est inférieure à 6% avec un pH réactionnel de 7.0, alors qu'elle atteint plus de 12% à pH 8.0. Dans le cas de l'enzeco[®] bacterial protease II (figure 2.2B), les valeurs DH après 60 minutes de réaction sont de 2% et 5.5% pour des pH réactionnels de 7.0 et 8.0, respectivement. L'attaque des protéines de lactosérum par l'alcalase et l'enzeco[®] bacterial protease II est donc facilitée à pH 8.0 et ce, probablement en raison de l'état monomérique de la β -lactoglobuline (Pessen et al., 1985). Dans le cas du calcium, son effet sur la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] est négligeable et ce, peu importe le pH réactionnel. Pour la suite des travaux, le pH réactionnel a donc été fixé à 8.0 et l'ajout de calcium dans le milieu réactionnel a été éliminé pour les deux enzymes à l'étude.

Un dernier paramètre à ajuster pour la mise au point d'un procédé d'hydrolyse enzymatique est le mode de contrôle de la réaction. En fait, il existe peu de méthode permettant de suivre la cinétique d'hydrolyse d'une protéine en cours de procédé. Les seules méthodes rapides, peu coûteuses et applicables à l'échelle industrielle sont la méthode pH-Stat et l'osmométrie. La méthode pH-Stat permet de déterminer le degré d'hydrolyse (DH) des protéines en cours de réaction et ce, en maintenant le pH réactionnel constant par l'ajout de base. Le principal avantage de cette méthode est le maintien de l'enzyme à son pH optimal tout au long de la réaction d'hydrolyse. Par contre, pour des durées d'hydrolyse élevées, la quantité de base ajoutée au milieu réactionnel est considérable ce qui augmente la teneur en sels du produit final et par conséquent, son goût salé. Il faut souligner que cet effet est non désirable pour la préparation d'un hydrolysate destiné à la fortification protéique d'un jus de fruits. D'autre part, l'osmométrie permet de déterminer le DH des protéines en cours de réaction par la mesure de la baisse du point de congélation. Cette méthode ne nécessite donc pas l'ajout de base pouvant affecter la saveur du produit mais par contre, elle n'assure pas le contrôle du pH en cours de réaction. Pour des durées d'hydrolyse élevées, le pH réactionnel diminue donc à des valeurs où l'activité de l'enzyme est ralentie ou encore, où l'on peut observer certains problèmes de

solubilité dans le milieu; précipitation ou gélification des protéines intactes dans l'hydrolysats à des valeurs de pH près de leur pI et ce, avant ou après le traitement thermique de désactivation de l'enzyme.

Pour sélectionner ce dernier paramètre, nous avons donc mesuré la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] pour des réactions contrôlées soit par la méthode pH-Stat, soit par une combinaison des méthodes pH-Stat et osmométrie. Avec cette dernière option, les réactions ont été contrôlées par pH-Stat jusqu'à une valeur DH de 4%, suivi du contrôle de la réaction par osmométrie. La figure 2.3 illustre la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] obtenue à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II, mesurée par la méthode pH-Stat et par une combinaison des méthodes pH-Stat et osmométrie. Dans le cas de l'alcalase, le contrôle du pH jusqu'à la fin de la réaction (méthode pH-Stat) améliore de façon importante la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®], comparé à celle obtenue avec un contrôle partiel du pH réactionnel (méthodes pH-Stat/osmométrie). Après 75 minutes de réaction, la valeur DH du Bipro[®] atteint 24% avec un contrôle du pH jusqu'à la fin de la réaction, alors que cette valeur est de 18% avec un contrôle partiel du pH. Déjà à la figure 2.2, nous avons observé l'effet important du pH sur la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] par l'alcalase. Le DH plus faible (18%) obtenu avec un contrôle partiel du pH pourrait donc s'expliquer par la baisse du pH suivant l'arrêt de l'ajout de base (à DH 4%) dans le milieu réactionnel. En fait, après 75 minutes de réaction contrôlée par une combinaison des méthodes pH-Stat et osmométrie, le pH du milieu était de 6.6 ce qui pourrait expliquer la baisse importante de la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] (figure 2.3).

Dans le cas de l'enzeco[®] bacterial protease II (figure 2.3), les courbes d'hydrolyse sont comparables peu importe le mode de contrôle du pH en cours de réaction. On note toutefois une cinétique d'hydrolyse légèrement plus rapide en début de réaction (60 min) lorsque les méthodes pH-Stat et osmométrie sont utilisés en combinaison, comparé à celle obtenue avec la méthode pH-Stat seule. Avec cette enzyme, il est possible que l'ajout d'une grande quantité de base dans le milieu (méthode pH-Stat) affecte son activité.

Enfin, pour vérifier l'effet du mode de contrôle du pH de la réaction d'hydrolyse sur les caractéristiques physico-chimiques des hydrolysats, la teneur en minéraux, le ratio AN/TN et le profil de poids moléculaire des composantes protéiques des différents hydrolysats ont été analysés; les résultats de ces analyses sont présentés au tableau 2.2. Du point de vue de la composition minérale des échantillons, la teneur en sodium est plus élevée dans les hydrolysats obtenus avec un contrôle du pH jusqu'à la fin de la réaction, que ceux obtenus avec une combinaison des méthodes pH-Stat/osmométrie. Cette différence s'explique par l'arrêt de l'ajout de NaOH à une valeur DH de 4% pour les hydrolyses réalisées avec un contrôle partiel du pH. En fait, dans le cas des hydrolysats obtenus avec l'alcalase et l'enzeco[®] bacterial protease II, les teneurs en sodium des produits varient respectivement de 25 à 12% et de 15 à 10% selon le mode de contrôle de la réaction. La quantité plus importante de sodium (25%) dans l'hydrolysat obtenu avec l'alcalase et un contrôle de la réaction par pH-Stat, comparé à celui obtenu avec l'enzeco[®] bacterial protease II (15.2%), s'explique par le DH différent de ces deux hydrolysats. En effet, pour atteindre un DH ~24% avec l'alcalase, il a fallu ajouter une quantité plus importante de NaOH.

Dans le cas du ratio AN/TN, les valeurs obtenues reflètent le degré d'hydrolyse mesuré en fin de réaction (figure 2.3) pour les deux enzymes à l'étude. En effet, ces ratios sont comparables dans le cas de l'enzeco[®] bacterial protease II peu importe le mode utilisé pour le contrôle du pH alors que dans le cas de l'alcalase, la méthode pH-Stat donne un ratio AN/TN plus élevé (24.9) que celui obtenu (22.8) avec une combinaison des méthodes pH-Stat et osmométrie. Enfin, le profil de poids moléculaire des composantes protéiques des différents échantillons révèle un impact du mode de contrôle de la réaction d'hydrolyse sur la taille des peptides. En effet, dans le cas de l'alcalase (figure 2.3), le DH étant plus faible (18.1%) avec un contrôle partiel du pH comparé à celui (23.5%) obtenu avec un contrôle du pH jusqu'à la fin de la réaction, la teneur en peptides de faible poids moléculaire (<2000 Da) est diminuée et passe de 90% à 79%. Le même phénomène est observé pour l'enzeco[®] bacterial protease II, dont la teneur en peptides de poids moléculaire inférieur à 2000 Da est réduite de 58 à 46% avec un contrôle total et partiel du pH.

En résumé, le principal désavantage du contrôle du pH jusqu'à la fin de la réaction est l'augmentation importante de sodium dans le produit et un ralentissement probable de l'activité de l'enzeco[®] bacterial protease II en présence d'une certaine quantité de sel. Bien que le degré d'hydrolyse du Bipro[®] (DH et AN/TN) et la teneur en peptides de faible taille soit également affecté par ce mode de contrôle, nous avons opté pour le contrôle de la réaction par une combinaison des méthodes pH-Stat et osmométrie et ce, afin de minimiser l'impact du procédé sur la saveur des hydrolysats protéiques.

La dernière étape de la mise au point des conditions enzymatiques consistait à sélectionner un traitement thermique de désactivation de l'enzyme en fin de réaction. Ce traitement est important dans la mesure où il peut affecter la solubilité de l'hydrolysat final et qu'il doit être suffisamment sévère pour assurer la désactivation complète de l'enzyme. D'autre part, les conditions de désactivation des enzymes sont variables et dépendent de la stabilité des enzymes en fonction de la température, du pH et de la durée du traitement. Enfin, il est extrêmement difficile de mesurer l'activité enzymatique résiduelle dans un hydrolysat protéique, où l'enzyme et son substrat s'y trouvent combinés. Les méthodes courantes de dosage de l'activité d'une enzyme à l'aide de substrats synthétiques ne s'appliquent donc pas, puisqu'avec ces méthodes, il est impossible de quantifier la contribution de l'enzyme pour l'hydrolyse du substrat synthétique et son action sur le substrat protéique déjà présent dans l'hydrolysat. Par conséquent, nous avons utilisé la méthode AN/TN pour mesurer l'activité enzymatique résiduelle dans les hydrolysats et ce, après l'application de différents traitements thermiques de désactivation: 85°C/5 min, 75°C/10 min, 65°C/15 min, 55°C/20 min. Pour cette étude, les traitements thermiques de désactivation des enzymes ont été appliqués à des mélanges réactionnels ajustés à pH 6.5, qui représente le pH final des hydrolysats obtenus avec un contrôle partiel du pH (pH-Stat/osmométrie). Avec la méthode du ratio AN/TN, qui consiste à mesurer le pourcentage d'azote aminé libre par rapport à l'azote total de l'échantillon, une augmentation de la valeur AN/TN dans un échantillon désactivé, puis agité à nouveau pendant 60 minutes à 45°C, indique que l'enzyme n'a pas été désactivée complètement par le traitement thermique; les résultats de cette étude sont présentés au tableau 2.3.

Avec l'alcalase, on observe que l'enzyme est désactivée par des traitements thermiques de 85°C/5 min, 75°C/10 min et 65°C/15 min, les ratios AN/TN étant comparables après la désactivation et suite à une agitation additionnelle d'une heure à 45°C. Par contre, le traitement thermique de 55°C/20 min ne permet pas d'inactiver complètement l'alcalase, puisqu'une quantité plus grande d'azote aminé libre est mesurée dans l'échantillon désactivé et agité 60 minutes à 45°C. Dans le cas de l'enzeco[®] bacterial protease II, on note qu'un traitement plus sévère (75°C/10 min) que celui de l'alcalase (65°C/15 min) doit être appliqué en fin de réaction pour assurer la désactivation complète de l'enzyme. La stabilité thermique de cette enzyme à pH 6.5 serait donc supérieure à celle de l'alcalase. Pour la désactivation thermique de l'alcalase et l'enzeco[®] bacterial protease II, des traitements de 65°C/15 min et 75°C/10 min ont donc été sélectionnés, respectivement.

Une fois complétée la mise au point des conditions d'hydrolyse enzymatique du Bipro[®], deux hydrolysats ont été fabriqués à l'échelle pilote (14 L) à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II, en utilisant les paramètres sélectionnés précédemment: solution protéique à 20% ST, 45°C, ratio E:S de 1:10 et 1:25 pour l'alcalase et l'enzeco[®] bacterial protease II respectivement, contrôle du pH à 8.0 par pH-Stat jusqu'à une valeur DH de 4% suivi du contrôle de la réaction par osmométrie jusqu'à la fin de la réaction. Il est à noter que le pH réactionnel a été maintenu constant par l'ajout d'un mélange de base (NaOH/KOH) dans le but d'équilibrer le contenu en minéraux de l'ingrédient final. Par la suite, ces deux hydrolysats ont été congelés puis lyophilisés, et les poudres obtenues ont été analysées pour leur composition chimique (protéines, lipides, lactose, cendres, minéraux), leur ratio AN/TN et le profil de poids moléculaire de leurs composantes protéiques. Les résultats de ces analyses sont présentés au tableau 2.4, et les valeurs ont été comparées à celles obtenues pour le substrat initial, le Bipro[®].

La teneur en protéines du Bipro[®] et des hydrolysats varie de 88 à 94%. Ces ingrédients contiennent des traces (<1%) de lipides et de lactose alors qu'une quantité plus importante de cendres (~4%) dans les deux hydrolysats protéiques, comparé au Bipro[®] (~2%), s'explique par l'ajustement du pH en début d'hydrolyse (DH de 4%) via l'ajout de base (NaOH/KOH) dans le

milieu réactionnel. On remarque également que l'utilisation d'un mélange de base plutôt que de NaOH seul a eu l'effet souhaité d'équilibrer les teneurs en sodium et en potassium dans les hydrolysats, dont les teneurs sont maintenant de 7 à 10%. Les valeurs AN/TN des deux hydrolysats sont comparables à celles du tableau 2.2; la préparation à l'échelle pilote des deux hydrolysats n'a donc pas modifié ce paramètre.

Finalement, le profil de poids moléculaire du Bipro[®] est modifié suite à son hydrolyse par les deux enzymes, avec une diminution importante de la teneur en protéines intactes (>10000 Da) dans le produits, au profit des peptides de petite taille (<5000 Da). En effet, dans le cas de l'alcalase, l'hydrolysats est composé de plus de 90% de peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 5000 Da alors qu'avec l'enzeco[®] bacterial protease II, la teneur de l'hydrolysats en ces peptides est d'environ 55%. La plus faible quantité de peptides de petite taille dans cet hydrolysats peut s'expliquer par le degré d'hydrolyse plus faible des protéines obtenu avec cette enzyme (AN/TN de 17.4%), comparé à celui obtenu avec l'alcalase (AN/TN de 22.5%). Aussi, il est possible que le traitement thermique plus sévère (75°C, 10 min) utilisé pour l'inactivation de l'enzeco[®] bacterial protease II, comparé à celui appliqué pour la dénaturation de l'alcalase (65°C, 15 min), ait entraîné la formation d'une quantité plus grande d'agrégats protéiques dans l'hydrolysats; il est à noter que ces agrégats sont alors intégrés dans les composantes protéiques de poids moléculaire supérieur à 10000 Da. En conclusion, les hydrolysats préparés à l'échelle pilote présentent des compositions chimiques relativement semblables, alors que leur degré d'hydrolyse (ratio AN/TN) et le profil de poids moléculaires de leurs composantes protéiques sont les paramètres qui les différencient le plus.

La dernière étape de notre étude consistait à évaluer le potentiel de ces hydrolysats pour la fortification protéique d'un jus d'orange. En fait, la première limite à l'ajout d'une protéine dans un jus de fruits à pH acide est la solubilité de la source protéique à ce pH. La solubilité (méthode NSI) du Bipro[®] et des deux hydrolysats protéiques a donc été évaluée dans une solution aqueuse à pH 7.0, dans une solution modèle reproduisant les conditions d'un jus de fruits (pH 2.5, 9.2% sucre inverti, 2% pectine, 0.5% ac. citrique) et dans un jus d'orange. Il est

à noter que la composition de la solution modèle nous a été fournie par la compagnie Lassonde Inc.

Le tableau 2.5 présente les résultats obtenus pour la mesure de solubilité des trois substrats dans les trois solutions étudiées. Le Bipro[®], très soluble (98.6%) en solution aqueuse, perd un peu de solubilité (90.6%) à pH 2.5 alors que sa solubilité dans le jus d'orange est la plus faible, soit ~80%. Dans le cas de l'hydrolysat obtenu avec l'alcalase, sa solubilité en solution aqueuse est plus faible (80%) que celle du Bipro[®] (98.6%), mais elle est peu influencée par les conditions du milieu. En effet, la solubilité de cet hydrolysat demeure à 75-80% qu'il soit ajouté à la solution modèle ou à du jus d'orange. Enfin, la solubilité de l'hydrolysat obtenu à l'aide de l'enzeco[®] bacterial protease II est comparable à celle du Bipro[®] (~99%) à pH 7.0, mais elle diminue de façon importante à pH acide, avec des valeurs près de 68% dans la solution modèle (pH 2.5) et dans le jus d'orange (pH3.8).

Afin de vérifier l'impact de la solubilité des ingrédients protéiques sur l'apparence du produit, la turbidité de la solution modèle a été mesurée suite à l'ajout des trois ingrédients protéiques selon quatre cotes protéiques: 16, 20, 24, 28. En raison de l'opacité du jus d'orange, cette analyse n'a pas été effectuée dans ce milieu. Le tableau 2.6 présente les résultats de cette analyse. Les valeurs de densité optique (D.O.) montrent que l'hydrolysat obtenu avec l'enzeco[®] bacterial protease II donne un produit plus turbide que ceux obtenus avec le Bipro[®] et l'hydrolysat préparé avec l'alcalase. En fait, même à l'oeil nu, il était possible de visualiser les problèmes de solubilité et de turbidité de cet hydrolysat dans la solution modèle. En effet, un culot blanchâtre était présent au fond des bouteilles pour tous les ingrédients protéiques étudiés, mais celui observé dans le cas de l'hydrolysat obtenu à l'aide de l'enzeco[®] bacterial protease II était plus important. Enfin, il est à noter que la turbidité de même que l'épaisseur du culot au fond des bouteilles étaient plus prononcés lorsque la cote protéique augmentait de 16 à 28.

Pour vérifier l'impact de l'ajout des ingrédients protéiques sur la consistance du produit, la viscosité de la solution modèle et du jus d'orange a été mesurée suite à l'addition des trois

ingrédients protéiques selon les quatre cotes protéiques sélectionnées; les résultats de cette analyse sont présentés au tableau 2.7. Dans le cas du Bipro[®], son ajout dans la solution modèle selon les quatre cotes protéiques influence peu la viscosité de cette solution, dont la valeur initiale est de 4.3 Cps et qui augmente à moins de 5 Cps suite à l'ajout de 8.75g de protéines (cote protéique de 28) dans une portion de 175 ml. Dans le jus d'orange, l'ajout de Bipro[®] amène une augmentation plus importante de la viscosité. En effet, la viscosité initiale du jus d'orange est de 12.2 Cps et cette valeur augmente à 14.5 Cps avec une cote protéique de 16, et à 18.5 Cps lorsque la cote protéique est de 28. Dans le cas des ingrédients hydrolysés, leur ajout tant à la solution modèle qu'au jus d'orange a pour effet d'augmenter de façon plus importante la viscosité des milieux, l'hydrolysate obtenu avec l'enzeco[®] bacterial protease II étant celui qui influence le plus ce paramètre. Dans le jus d'orange, l'ajout de cet hydrolysate à des cotes protéiques de 16 à 28 augmente la viscosité à des valeurs de 22 à 33 Cps.

Enfin, le dernier critère à évaluer pour le choix d'un ingrédient protéique destiné à la fortification d'un jus d'orange est sa solubilité suite à la pasteurisation du produit. Dans le cas du jus d'orange, les conditions de pasteurisation sont de 96°C, 30 sec. Pour vérifier l'effet de ce type de traitement thermique sur la solubilité des ingrédients protéiques, nous avons utilisé un test fourni par la compagnie Lassonde Inc. Ce test consiste à préparer, dans une bouteille de verre, la solution additionnée du substrat protéique et à plonger cette solution dans un bain d'eau bouillante (100°C) pendant 7 minutes; si un précipité est observé dans le produit suite à ce traitement thermique, il ne pourra subir l'étape de pasteurisation du produit. Ce test étant qualitatif, il a été modifié en y combinant une mesure de l'indice de solubilité de l'azote (NSI) dans les solutions après l'application du traitement thermique. Le tableau 2.8 présente donc la valeur NSI obtenu après le traitement thermique de la solution modèle et du jus d'orange, additionnés des trois ingrédients protéiques selon les quatre cotes protéiques à l'étude.

C'est ici que se démarquent le plus les ingrédients hydrolysés comparé au substrat initial, le Bipro[®]. En effet, suite au traitement thermique, le Bipro[®] est quasi insoluble (4-8%) dans la solution modèle, alors que sa solubilité dans le jus d'orange varie de 25 à 48% pour des cotes protéiques de 16 et 28, respectivement. On observe également que dans la solution modèle, la

solubilité du Bipro[®] diminue avec la quantité de protéines additionnées au milieu, alors que l'effet inverse est obtenu lorsque le Bipro[®] est ajouté au jus d'orange. En fait, la solubilité des protéines de lactosérum étant étroitement liée à la force ionique et au pH du milieu, il est possible que le jus d'orange offre un environnement physico-chimique plus favorable à la solubilisation de ces protéines (Kinsella et al., 1989; Robin et al., 1993). De plus, il est possible que l'interaction de ces protéines avec les polysaccharides présents dans le jus contribuent à améliorer leur solubilité dans ce type de milieu (Robin et al., 1993), surtout après l'application d'un traitement thermique sévère.

Dans le cas de l'hydrolysate obtenu avec l'alcalase, sa solubilité demeure supérieure à 77%, qu'il soit ajouté à la solution modèle ou au jus d'orange et ce, peu importe la cote protéique. En fait, une seule exception est notée lorsqu'il est ajouté à la solution modèle selon une cote protéique de 28, où la solubilité de cet ingrédient diminue alors à 75%. Pour l'hydrolysate obtenu avec l'enzeco[®] bacterial protease II, sa solubilité varie de 71 à 88% selon le milieu et la cote protéique étudiés, avec des valeurs de solubilité toujours supérieures dans la solution modèle comparé à celles obtenues dans le jus d'orange. D'autre part, alors que la solubilité de cet hydrolysate diminue avec la cote protéique dans la solution modèle, un comportement inverse est observé dans le jus d'orange. Comme pour le Bipro[®], il semble que la présence de certaines composantes (polysaccharides, ions) dans le jus d'orange favorisent la solubilité des protéines et des peptides contenus dans cet hydrolysate.

La figure 2.4 est une photographie des jus d'orange additionnés (cote protéique de 20) de Bipro[®] et des hydrolysates protéiques préparés à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II; ces jus d'orange ont été photographiés après l'application du traitement thermique (100°C/7 min). On observe que le jus d'orange à base de Bipro[®] a perdu sa coloration orangée pour donner un produit blanchâtre. De plus, des traces de précipités sont visibles sur la paroi de la bouteille de verre, indiquant la faible solubilité de cet ingrédient dans le jus d'orange suite à son traitement thermique. Dans le cas de l'hydrolysate obtenu avec l'enzeco[®] bacterial protease II, le produit est également blanchâtre, mais avec une note orangée plus prononcée, et des traces de précipités apparaissent sur la paroi de la bouteille. Avec l'hydrolysate préparé à

partir de l'alcalase, la coloration du jus d'orange se rapproche de celle du témoin (jus d'orange sans protéines) et aucune trace de précipité n'est visible dans le produit. L'apparence des jus fortifiés en protéines suite au traitement thermique reflète donc les résultats obtenus au tableau 2.8 qui démontraient que l'hydrolysate préparé à partir de l'alcalase est le plus soluble dans le jus d'orange suite à l'application du traitement thermique, suivi de l'hydrolysate obtenu avec l'enzeco[®] bacterial protease II et enfin du Bipro[®].

Bien qu'aucune évaluation sensorielle des jus d'orange fortifiés en ingrédients protéiques n'ait été réalisée de façon standardisée et avec l'aide d'un panel de dégustation, la saveur de ces jus a été jugée par une dizaine d'individus. Cette évaluation préliminaire a démontré que les jus fortifiés à partir de l'hydrolysate préparé avec l'enzeco[®] bacterial protease II présentaient une saveur plutôt neutre, sans aucune trace d'amertume. Par contre, la saveur des jus à base d'hydrolysate obtenu avec l'alcalase a été qualifiée d'inacceptable par tous les individus et ce, en raison d'un goût fortement amer.

Par conséquent, malgré l'avantage nutritionnel conféré au Bipro[®] suite à son hydrolyse enzymatique en terme de contenu en peptides facilement assimilable par l'organisme, et l'amélioration de la stabilité thermique du Bipro[®] dans le jus d'orange suivant son hydrolyse enzymatique, les ingrédients hydrolysés préparés dans le cadre de cette étude présentent certains problèmes pouvant limiter leur addition à forte concentration dans les jus de fruits. Dans le cas de l'hydrolysate obtenu à l'aide de l'enzeco[®] bacterial protease II, il faudrait améliorer la stabilité thermique de cet ingrédient dans le jus d'orange. Pour améliorer ce paramètre, on peut envisager l'ajout d'une étape d'ultrafiltration au procédé d'hydrolyse et ce, afin de stopper la réaction enzymatique via la séparation physique de l'enzyme du milieu réactionnel. L'arrêt de la réaction d'hydrolyse par ultrafiltration permettrait ainsi d'éliminer le traitement de désactivation de l'enzyme, lequel affecte probablement la solubilité finale de l'ingrédient. Enfin, dans le cas de l'hydrolysate préparé avec l'alcalase, il faudrait résoudre le problème d'amertume de cet hydrolysate. Pour améliorer la saveur de cet ingrédient, on peut alors envisager l'ajout d'une exopeptidase, reconnue pour son activité désamérisante. Ce type

d'enzyme est disponible sur le marché et cette option ne nécessiterait pas de modification majeure au procédé d'hydrolyse.

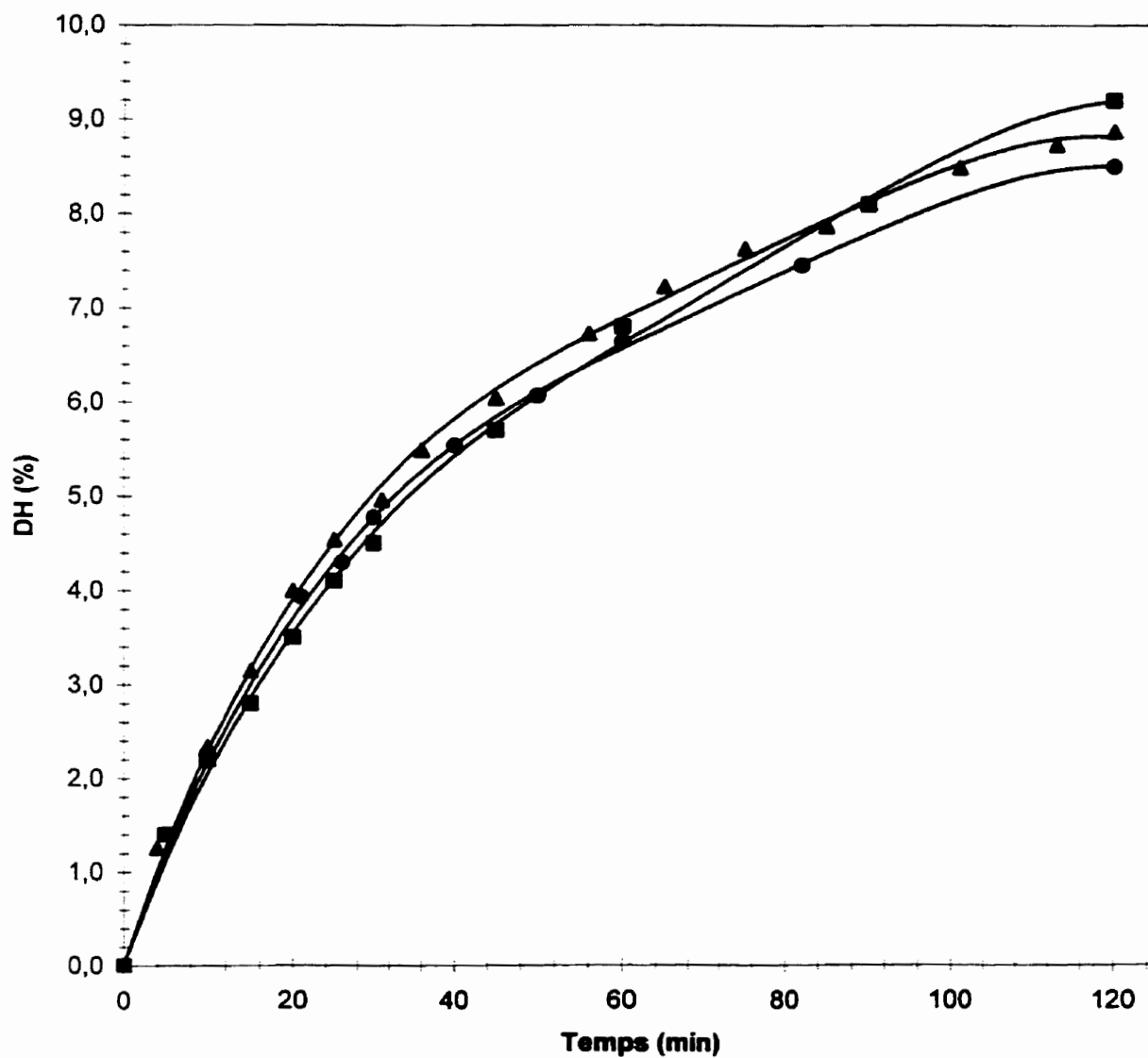
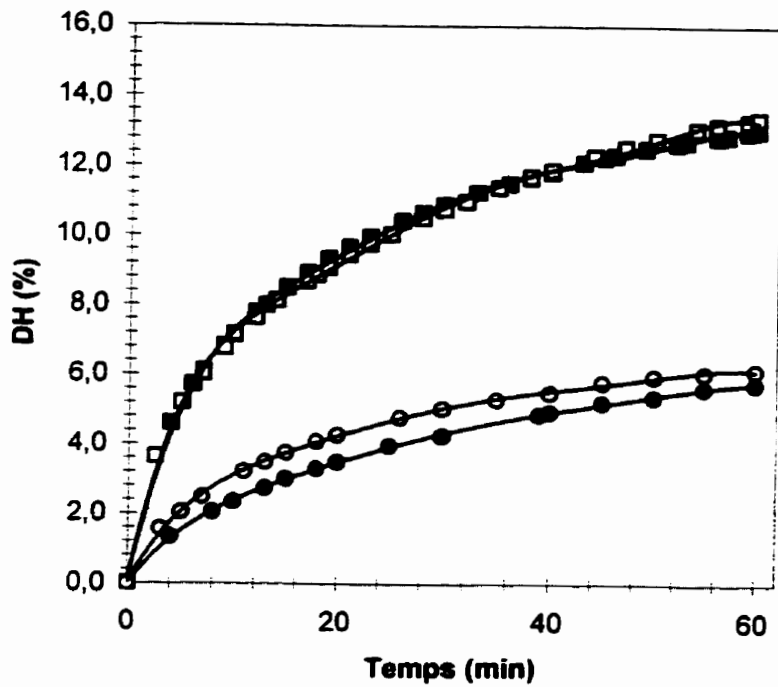


Figure 2.1: Cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] obtenue à l'aide de l'alcalase (●), de la chymotrypsine (■) et de l'enzeco[®] bacterial protease II (▲).

A)



B)

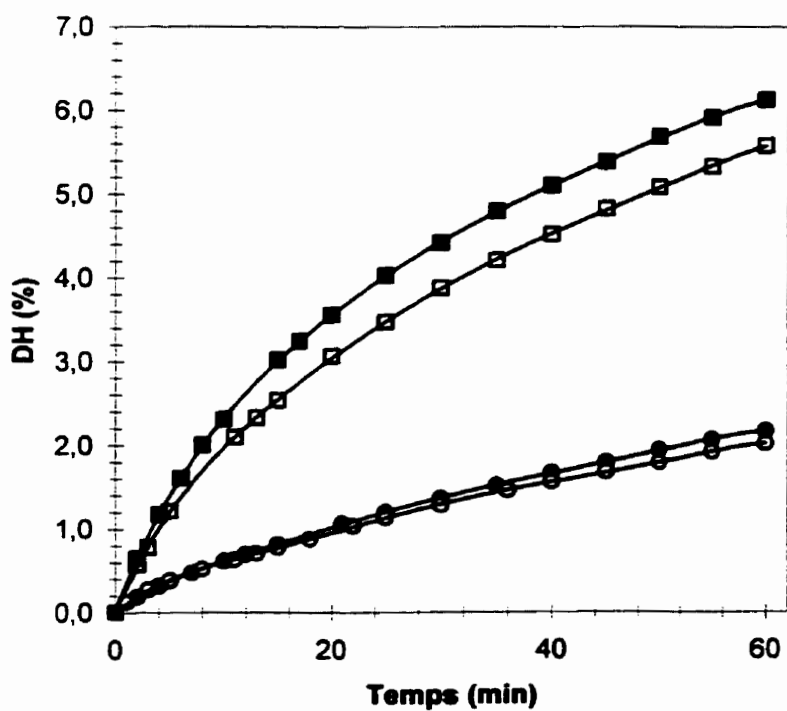


Figure 2.2: Effet du pH et de la présence de calcium sur la cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] obtenue à l'aide de l'alcalase (A) et de l'enzeco[®] bacterial protease II (B); (●) pH7.0; (○) pH7.0 avec CaCl₂; (■) pH8.0; (□) pH8.0 avec CaCl₂.

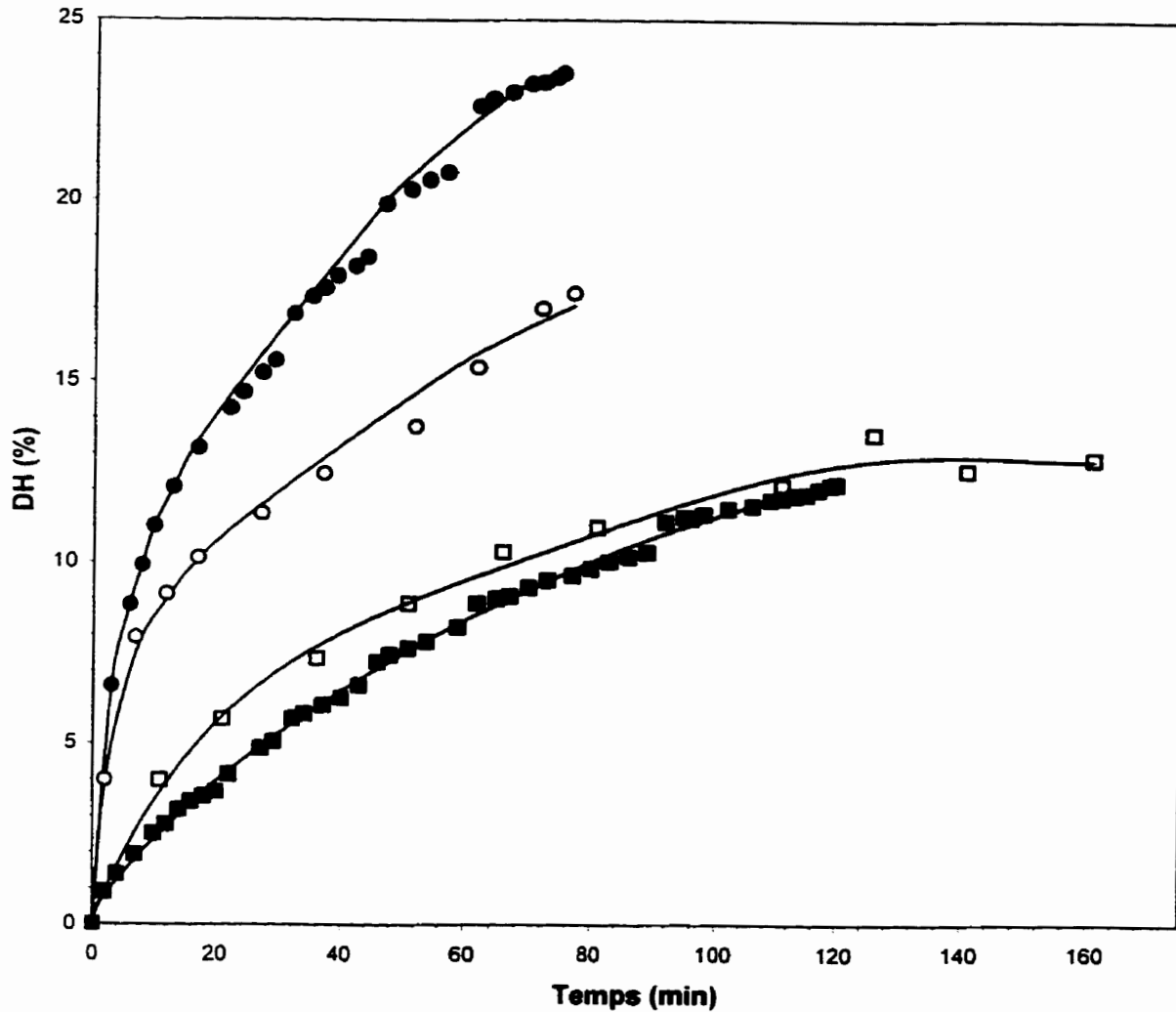


Figure 2.3: Cinétique d'hydrolyse du Bipro[®] obtenue à l'aide de l'alcalase (●, ○) et de l'enzeco[®] bacterial protease II (■, □), mesurée par la méthode pH-Stat (●, ■) et par une combinaison des méthodes pH-Stat et osmométrie (○, □).

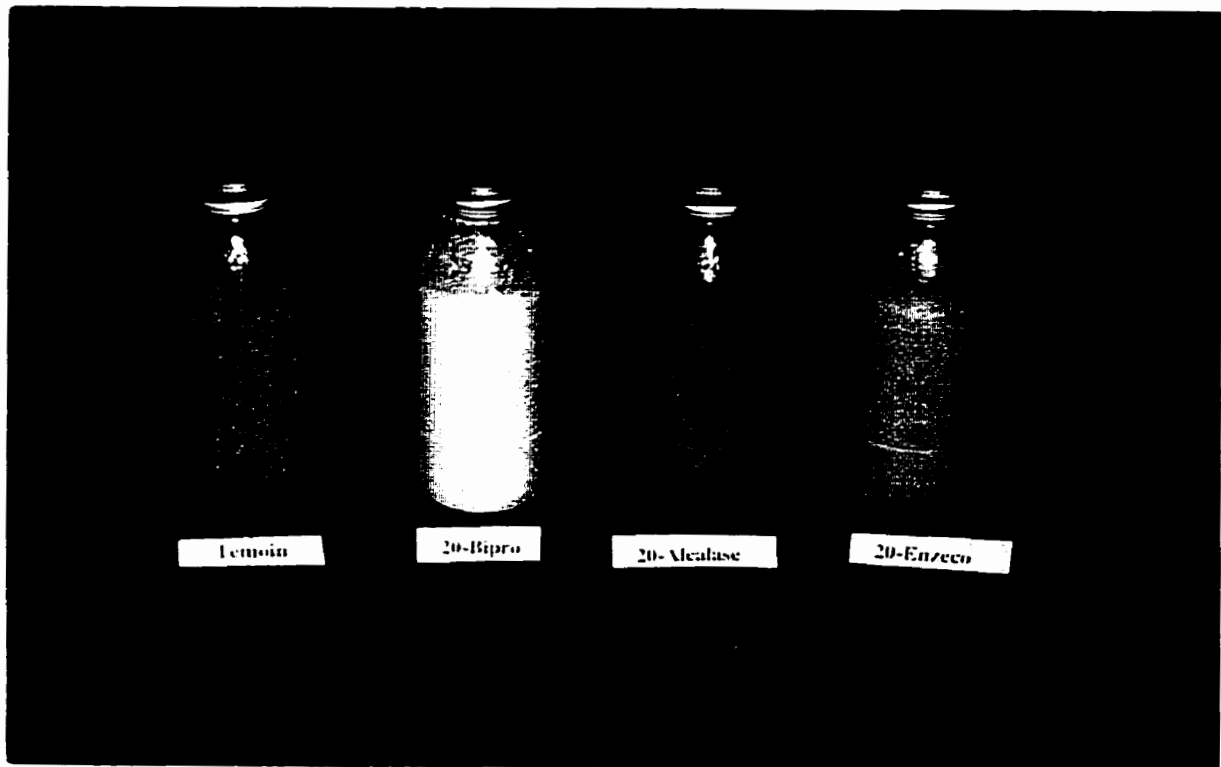


Figure 2.4: Comparaison des jus d'orange additionnés (cote protéique de 20) de Bipro[®] et des hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II. Les produits ont été photographiés après l'application du traitement thermique (100°C, 7 min).

Tableau 2.1: Comparaison du profil (%) de poids moléculaire des composantes protéiques du Bipro® et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'alcalase, de la chymotrypsine et de l'enzeco® bacterial protease II.

	Bipro®	Alcalase	Chymotrypsine	Enzeco® bacterial protease II
Profil de poids moléculaire (%):				
> 10000 Da	98.6	0.3	44.4	36.4
5000-10000 Da	0.8	0.7	4.3	7.4
2000-5000 Da	0.4	9.9	15.2	14.2
< 2000 Da	0.2	89.2	35.9	42.1

Tableau 2.2: Effet du contrôle du pH en cours d'hydrolyse sur la composition minérale, le ratio AN/TN et le profil de poids moléculaire des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II.

	Alcalase		Enzeco [®] bacterial protease II	
	pH-Stat ¹	pH-Stat/ osmométrie ¹	pH-Stat ²	pH-Stat/ osmométrie ³
Minéraux (mg/g):				
Sodium	25.1	12.3	15.2	11.1
Potassium	0	0	0	0
Calcium	0.9	0.9	1.0	1.1
Magnésium	0.1	0.1	0.2	0.1
Phosphate	0	0	0.1	0.2
AN/TN (%)	24.9	22.8	17.6	17.5
Profil de poids moléculaire (%):				
> 10000 Da	0.2	0.4	36.6	31.3
5000-10000 Da	0.9	3.3	4.5	8.2
2000-5000 Da	8.9	17.6	1.5	14.9
< 2000 Da	90.1	78.7	57.5	45.6

¹: durée d'hydrolyse: 75 minutes; ²: durée d'hydrolyse: 120 minutes; ³: durée d'hydrolyse: 150 minutes.

Tableau 2.3: Effet des conditions (T°, durée) du traitement thermique de désactivation de l'alcalase et de l'enzeco® bacterial protease II sur le ratio AN/TN (%) mesuré après la désactivation de l'enzyme et après une durée additionnelle d'agitation de 60 minutes à 45°C.

Désactivation	Alcalase	Enzeco® bacterial protease II
85°C / 5 min		
après désactivation	16.4	13.0
après agitation	16.2	12.5
75°C / 10 min		
après désactivation	18.7	12.8
après agitation	18.2	12.7
65°C / 15 min		
après désactivation	20.8	14.8
après agitation	20.4	15.9
55°C / 20 min		
après désactivation	18.4	15.2
après agitation	20.3	16.9

Tableau 2.4: Caractéristiques physico-chimiques du Bipro[®] et des hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II.

	Bipro [®]	Alcalase	Enzeco [®] bacterial protease II
Composantes (% base humide):			
Protéines	93.8	87.6	92.9
Lactose	<1.0	<1.0	<1.0
Matière grasse	<1.0	<1.0	<1.0
Cendres	1.8	3.8	4.1
Minéraux (mg/g):			
Sodium	4.5	7.1	7.6
Potassium	0.6	9.4	10.7
Calcium	0.7	1.0	1.1
Magnésium	0.1	0	0.3
Phosphate	0.1	0.1	0.2
AN/TN (%)	9.0	22.5	17.4
Profil de poids moléculaire (%):			
> 10000 Da	98.6	1.9	34.2
5000-10000 Da	0.8	5.6	10.9
2000-5000 Da	0.4	34.6	24.6
< 2000 Da	0.2	58.0	30.3

Tableau 2.5: Indice (%) de solubilité de l'azote (NSI) du Bipro[®] et des hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II, mesuré en solution aqueuse (NSI standard), dans une solution modèle (NSI modifié) et dans un jus d'orange (NSI modifié).

Milieu	Bipro [®]	Alcalase	Enzeco [®] bacterial protease II
Solution aqueuse (pH 7.0)	98.6	80.0	99.8
Solution modèle (pH 2.5)	90.6	82.0	68.7
Jus d'orange (pH 3.8)	81.4	75.3	67.3

Tableau 2.6: Turbidité (D.O._{610 nm}) de la solution modèle, additionnée selon quatre cotes protéiques avec le Bipro[®] et les hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II.

Cote protéique	Bipro [®]	Alcalase	Enzeco [®] bacterial protease II
16	0.6	1.4	3.2
20	0.9	1.6	3.4
24	1.2	1.7	3.4
28	1.6	1.8	3.5

Tableau 2.7: Viscosité (centipoises) de la solution modèle et du jus d'orange, additionnés selon quatre cotes protéiques avec le Bipro® et les hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco® bacterial protease II.

Milieu	Cote protéique	Bipro®	Alcalase	Enzeco® bacterial protease II
Solution modèle ¹ :	16	4.6	5.0	5.3
	20	4.6	5.5	6.1
	24	4.7	5.8	6.8
	28	4.9	6.1	7.8
Jus d'orange ² :	16	14.5	17.3	21.8
	20	16.6	19.1	24.4
	24	18.1	21.4	27.2
	28	18.5	23.7	32.9

¹: la viscosité de la solution modèle seule est de 4.3 Cps;

²: la viscosité du jus d'orange seul est de 12.2 Cps.

Tableau 2.8: Indice (%) de solubilité de l'azote (NSI) suivant le traitement thermique (100°C, 7 min.) de la solution modèle et du jus d'orange, additionnés selon quatre cotes protéiques avec le Bipro[®] et les hydrolysats protéiques obtenus à l'échelle pilote à l'aide de l'alcalase et de l'enzeco[®] bacterial protease II.

Milieu	Cote protéique	Bipro [®]	Alcalase	Enzeco [®] bacterial protease II
Solution modèle:	16	8.1	77.3	88.2
	20	6.6	77.6	74.9
	24	5.7	77.2	76.1
	28	4.0	74.6	77.9
Jus d'orange:	16	24.5	77.1	66.4
	20	33.6	76.9	71.0
	24	35.9	77.3	72.6
	28	47.5	78.8	73.3

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet de recherche avait pour but de mettre au point un hydrolysate enzymatique de protéines de lactosérum pour la fortification protéique d'un jus d'orange et ce, en vue de la fabrication d'une boisson nutraceutique destinée aux sportifs, aux adolescents, aux personnes âgées ou aux individus sous régime amaigrissant. Il a été élaboré à partir d'une problématique voulant qu'à l'état natif, les protéines de lactosérum subissent une perte de solubilité suite à leur traitement thermique (pasteurisation, stérilisation) sous conditions acides (jus de fruits), et qu'il est alors impossible de les additionner à une concentration respectant les exigences réglementaires (cote protéique minimale de 20) pour la fabrication d'un jus de fruits fortifié en protéines. L'hydrolyse enzymatique des protéines de lactosérum visait donc à améliorer la solubilité de ces protéines dans l'environnement physico-chimique d'un jus de fruits, mais aussi à améliorer la qualité nutritive de ces protéines via la libération d'une forte proportion (>50%) de peptides de petites tailles (<5000 Da), reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme. Enfin, l'ensemble du projet a été réalisé dans un souci de mise à l'échelle industrielle du procédé de fabrication de l'hydrolysate enzymatique de protéines de lactosérum.

La première étape de ce projet de recherche consistait à mettre au point les conditions d'hydrolyse enzymatique des protéines de lactosérum pour l'obtention d'un mélange riche en peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da). Un isolat de protéines de lactosérum, le Bipro[®], a donc été hydrolysé sous différentes conditions en variant les paramètres suivants: nature de l'enzyme (chymotrypsine, alcalase, enzeco[®] bacterial protease II), pH réactionnel (7.0, 8.0), présence de calcium dans le milieu, mode de contrôle de la réaction d'hydrolyse (pH-Stat, pH-Stat/osmométrie), conditions de désactivation thermique des enzymes en fin de réaction (85°C/5 min, 75°C/10 min, 65°C/15 min, 55°C/20 min). Cette étude nous a permis de démontrer que 1) les enzymes alcalase et enzeco[®] bacterial protease II hydrolysent fortement (AN/TN >15%) les protéines de lactosérum; 2) ces enzymes mènent à la libération d'une forte proportion (>50%) de peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da); 3) l'hydrolyse des protéines de lactosérum par ces enzymes est plus rapide à pH 8.0 qu'à pH 7.0 et ce, probablement en raison de l'état monomérique de ces protéines à pH 8.0; 4) la présence de

calcium dans les milieux réactionnels ne permet pas d'améliorer la cinétique d'hydrolyse des protéines de lactosérum par ces enzymes; 5) le contrôle des réactions d'hydrolyse par une combinaison des méthodes pH-Stat/osmométrie, plutôt que par la méthode pH-Stat seule, réduit la cinétique d'hydrolyse des protéines de lactosérum par l'alcalase mais influence de façon négligeable celle obtenue à l'aide de l'enzeco[®] bacterial protease II; 6) la combinaison des méthodes pH-Stat/osmométrie pour le contrôle de la réaction d'hydrolyse permet de réduire de façon importante (<25%) la teneur en sodium des hydrolysats comparé à ceux obtenus avec un contrôle du pH réactionnel jusqu'à la fin de la réaction (méthode pH-Stat); 7) la désactivation complète des enzymes alcalase et enzeco[®] bacterial protease II en fin de réaction est obtenue suivant l'application d'un traitement thermique de 65°C/15 min et 75°C/10 min, respectivement.

Cette première étape du projet nous a permis d'identifier les conditions optimales de préparation, à l'échelle pilote, des deux hydrolysats enzymatiques de protéines de lactosérum par les enzymes alcalase et enzeco[®] bacterial protease II, et de procéder à la caractérisation complète de ces hydrolysats afin d'évaluer leur potentiel à titre d'ingrédients nutraceutiques. Il a été démontré que ces hydrolysats présentent de nombreux avantages nutritionnels pour la fortification protéique de jus de fruits. En effet, ces ingrédients contiennent une teneur élevée en protéines (>88%) de bonne qualité nutritive (CEP 3.2), composées majoritairement (>55%) de peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da) qui sont reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme. De plus, ces ingrédients sont pauvres en matières grasses (<1%) et en lactose (<1%) et leur teneur en cendres est inférieure à 5% avec un contenu équilibré en sodium et potassium, ce qui est très acceptable pour le type d'application visée.

La dernière étape de ce projet de recherche consistait alors à évaluer le comportement de ces deux ingrédients hydrolysés dans l'environnement physico-chimique d'un jus d'orange et surtout, à mesurer leur stabilité thermique dans le jus d'orange suivant l'application d'un traitement thermique sévère (100°C/7 min), reproduisant les conditions de pasteurisation normale des jus de fruits. Il a été démontré que l'hydrolysat obtenu à l'aide de l'enzeco[®] bacterial protease II est moins soluble dans le jus d'orange (NSI 67%) que le substrat initial

(NSI 81%), le Bipro[®], et qu'il donne des solutions plus turbides et plus visqueuses que celles préparées avec le Bipro[®] et ce, pour les quatre cotes protéiques étudiées (16, 20, 24, 28). Par contre, sa stabilité thermique dans le jus d'orange suivant l'application d'un traitement thermique sévère est supérieure (NSI 66-73%) à celle obtenue par le Bipro[®] (NSI 24-48%) dans les mêmes conditions. Enfin, l'addition de cet hydrolysate à un jus d'orange provoque un changement important de la coloration du jus, avec l'apparition dans le produit d'un dépôt blanchâtre inacceptable, mais aucune trace d'amertume n'a été détectée dans les jus fortifiés à partir de cet hydrolysate. Dans le cas de l'hydrolysate obtenu avec l'alcalase, son évaluation dans le jus d'orange a révélé que cet hydrolysate était mieux adapté à la fortification protéique des jus de fruits. En effet, la solubilité de cet ingrédient dans le jus d'orange est supérieure (NSI 75%) à celle obtenue avec l'hydrolysate préparé à l'aide de l'enzeco[®] bacterial protease II (NSI 67%), cet ingrédient donne des solutions moins turbides et moins visqueuses que celles préparées avec le premier hydrolysate, et il demeure plus soluble (NSI 79%) après le traitement thermique du jus d'orange que l'hydrolysate obtenu à l'aide de l'enzeco[®] bacterial protease II (NSI 73%). Aussi, l'apparence des jus additionnés de l'hydrolysate obtenu à l'aide de l'alcalase est moins affectée que celle des jus fortifiés avec l'hydrolysate préparé à partir de l'enzeco[®] bacterial protease II. En effet, la coloration orange du jus est mieux conservée et aucun précipité n'est visible dans le produit. Par contre, la saveur du jus est fortement affectée par l'ajout de l'hydrolysate obtenu à l'aide de l'alcalase, avec une note d'amertume très prononcée.

Les résultats de cette étude ont donc permis de confirmer l'hypothèse de départ et d'identifier des conditions d'hydrolyse des protéines de lactosérum pour l'obtention d'ingrédients riches en peptides de faible poids moléculaire (<5000 Da) et demeurant solubles, du moins à plus de 70%, dans le jus d'orange suivant leur addition à forte concentration (cote protéique de 20) et suite à l'application d'un traitement thermique sévère (100°C, 7 min). Toutefois, notre étude a révélé certains problèmes, en outre au niveau de l'apparence (hydrolysate obtenu avec l'enzeco[®] bacterial protease II) et de la saveur (hydrolysate obtenu avec l'alcalase) des jus additionnés des deux hydrolysats, et qui devront être résolus avant de proposer ces hydrolysats enzymatiques à titre d'ingrédients nutraceutiques pour la fortification protéique des jus de fruits. Néanmoins, ces problèmes ne sont pas insurmontables et des moyens relativement

simples et applicables à l'échelle industrielle peuvent être envisagés. Dans le cas de l'hydrolysat préparé avec l'enzeco® bacterial protease II, il serait souhaitable de stopper la réaction d'hydrolyse via la séparation de l'enzyme du milieu réactionnel par ultrafiltration. L'ultrafiltration est déjà d'usage courant en industrie laitière et son utilisation, en remplacement du traitement thermique d'inactivation de l'enzyme, permettrait probablement d'améliorer la solubilité de cet hydrolysat dans le jus d'orange et d'augmenter sa teneur en peptides de petites tailles. Enfin, pour résoudre le problème d'amertume de l'hydrolysat préparé à partir de l'alcalase, on peut envisager l'utilisation d'une exopeptidase, en combinaison avec l'alcalase, de manière à hydrolyser les peptides amers libérés par la protéase en cours de réaction. Cette pratique est très courante chez les fabricants d'hydrolysats protéiques pour la désamérisation de certains produits.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adler-Nissen, J. (1976). Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 24(6): 1090-1093.

Adler-Nissen, J. (1977). Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochem.*, 12.: 18-23, 32.

Anonyme (1983). Nature's wonder: a dairy snack drink? *Dairy Record*, Nov.: 31-32.

Anonyme (1993). New perspectives. *Prepared Foods*, 162(8): 66-70.

Anson, M.L. et Mirsky, A.E. (1932). The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. of Gen. Physiol.*, 16: 59-63.

AOAC (1990a). Détermination de la teneur en matière grasse: Méthode du Mojonnier (#989.05). Association of official analytical chemists. 15th (ed). Washington, DC.

AOAC (1990b). Détermination des solides totaux et des cendres de la poudre de lait (#927.05,930.30). Association of official analytical chemists. 15th (ed). Washington, DC.

AOCS (1985). Détermination de l'indice de solubilité de l'azote: Méthode NSI (BA 11-65). Official and tentative methods of the American Oil Chemists Society. Revised edition.

Barbeau, J. (1995). Effet de fractions peptidiques sur la stabilité thermique de la β -lactoglobuline bovine. Mémoire de maîtrise.

Barbeau, J., Gauthier, S.F. et Pouliot, Y. (1996). Thermal stabilization of β -lactoglobulin by whey peptide fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3939-3945.

Barta, O., Barta, V.D., Crisman, M.V. et Akers, R.M. (1991). Inhibition of lymphocyte blastogenesis by whey. *Am. J. Veterinary Res.*, 52: 247-253.

Best, D. (1996a). Nutraceuticals : From theory to practice. *Prepared Foods*, 165(7): 53-57.

Best, D. (1996b). Nutraceuticals suit up to play. *Prepared Foods*, 165(1): 33-36.

Blenford, D.B. (1994). Protein hydrolysates - Functionalities and uses in nutritional products. *Int. Food Ingredients*, 3: 45-49.

Blomsma, C. (1997). The clear taste of innovation. *Int. Food Ingredients*, 6: 49.

Bounous, G., Baruchel, S., Falutz, J. et Gold, P. (1993). Whey proteins as a food supplements in HIV-seropositive individuals. *G. Clin. Invest. Med.*, 16: 204-209.

- Bounous, G., Kongshavn, P.A.L. et Gold, P. (1988a). The immuno enhancing property of dietary whey protein concentrate. *Clin. Invest. Med.*, 11: 271-278.
- Bounous, G., Papenburg, R., Kongshavn, P.A.L., Gold, P. et Fleischer, D. (1988b). Dietary whey protein inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. *Clin. Invest. Med.*, 11: 213-217.
- Brew, K. et Grobler, J.A. (1992). α -lactalbumin *dans* *Advanced Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), Elsevier Appl. Sci., London & NY, Vol. 1, chap. 5, pp.191-229.
- Bridger, J.C. et Brown, J.F. (1981). Development of immunity to porcine rotavirus in piglets protected from disease by bovine colostrum. *Infect. Immun.*, 31: 906-910.
- Britten, M., Giroux, H.J. et Gaudin, V. (1994). Effect of pH during heat processing of partially hydrolyzed whey protein. *J. Dairy Sci.*, 77: 676-684.
- Brüssow, H., Hilpert, H., Walther, I., Sidoti, J., Mietens, C. et Bachmann, P. (1987). Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile rotavirus gastro enteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 982-986.
- Bussien, H. (1998). Beverage trends. *World Ingrid.*, Mar.-Apr.: 10-13.
- Castro, S., Vazquez Peyronel, D. et Cantera, A.M.B. (1996). Proteolysis of whey proteins by a *Bacillus subtilis* enzyme preparation. *Int. Dairy J.*, 6: 285-294.
- Childs, N.M. (1995). Commercializing nutraceuticals and functional foods. *World Ingrid.*, Jan.-Feb.: 38-41.
- Colowick, S.P. et Kaplan, N.O. (1970). *Methods in enzymology*. Vol. XIX. Perlmann and Lorand (ed), Academic Press, NY and London, pp.64-215.
- Dalgleish, D.G. (1990). Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk. *J. Agric. Food Chem.*, 38(11): 1995-1999.
- DeFelice, S.L. (1995). The time has come for nutraceutical cereals. *Cereal Foods World*, 40(2): 51-52.
- de Wit, J.N. (1981). Structure and functional behaviour of whey proteins. *Neth. Milk Dairy J.*, 35: 47-64.
- de Wit, J.N. (1989a). Functionnal properties of whey proteins *dans* *Developments in Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), Elsevier Sci. publishers, London & NY, chap. 7, pp.285-317.
- de Wit, J.N. (1989b). The use of whey protein products *dans* *Developments in Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), Elsevier Sci. publishers, London & NY, chap. 8, pp.323-345.

- de Wit, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.*, 81: 597-608.
- de Wit, J.N. et Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 67: 2701-2710.
- de Wit, J.N., Klarenbeek, G. et Adamse, M. (1986). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and composition. *Neth. Milk Dairy J.*, 40: 41-56.
- Dodds, P. (1989). Whey beverage technology. *Cult. Dairy Prod. J.*, 24(2): 17-18, 20.
- Donovan, M. et Mulvihill, D.M. (1987). Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish J. Food Sci. Technol.*, 11(1): 87-100.
- Ebina, T., Sato, A., Umezv, K., Ishida, N., Ohyama, S., Oizumi, A., Aikawa, K., Katagiri, S., Katsushima, N., Imai, A., Kitaoka, S., Suzuki, H. et Konno, T. (1985). Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihuman rotavirus antibody. *Med. Microbiol. Immunol.*, 174: 177-185.
- Farrag, A.F., Askar, A.A., El-Din, H.M.F. et Abd El-Salam, M.H. (1997). Heat denaturation of whey protein concentrate as affected by some factors. *Milchwissenschaft*, 52(4): 204-208.
- Feeney, R.E. (1986). Tailoring proteins for food and medical uses: state of the art and interrelationships *dans* Protein tailoring for food and medical uses. Feenay, R.E., Whitaker J.R. (eds) Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-40.
- FIL (1993). Détermination de la teneur en azote: Méthode Kjeldahl (norme 20B). Norme FIL international.
- Frøkjær, S. (1994). Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, 48(10): 86-88.
- Gandhi, D.N. (1989). Whey utilization for beverages production. *Indian Dairyman*, 41(1): 35-37.
- Gauthier, S.F. (1996). Les nutraceutiques d'origine laitière. Rapport de Sabbatique. Université Laval, 184 pp.
- Gauthier, S.F., Paquin, P., Pouliot, Y. et Turgeon, S. (1993). Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 76: 321-328.
- Giese, J. (1995). Developments in beverage additives. *Food Technol.*, 49(9): 64-72.

- Giese, J. et Katz, F. (1997). Ethical marketing of functional foods. *Food Technol.*, 51(12): 58-61.
- Goff, H.D. et Hill, A.R. (1993). Chemistry and Physics *dans* Dairy Science and Technology Handbook. VCM Publishers Inc., Vol. 1, Chap. 1, pp.1-63.
- Gonzalez-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Paez, M.P. et Guadix, E.M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 529-532.
- Grijspaardt-Vink, C. (1996). Health and convenience top food trends in Europe. *Food Technol.*, 50(7): 28.
- Hambling, S. McAlpine, A.S. et Sawyer, L. (1992). β -lactoglobulin *dans* Advanced Dairy Chemistry. P.F. Fox (ed), Elsevier Appl. Sci., London & NY, Vol. 1, chap. 4, pp.141-179.
- Hambraeus, L. (1992). Nutritional aspects of milk proteins *dans* Advanced Dairy Chemistry. P.F. Fox (ed), Elsevier Appl. Sci., London & NY, Vol. 1, chap. 11, pp. 470-478.
- Harwalkar, V.R. (1979). Comparaison of physico-chemical properties of different thermally denatured whey proteins. *Milchwissenschaft*, 34: 419-422.
- Harwalkar, V.R. et Ma, C.Y. (1990). Study of thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis *dans* Thermal analysis of foods. P.F. Fox (ed), Elsevier Sci. Publishers, chap. 1, pp.16-50.
- Hilliam, M. (1995). The market for healthy and functional confectionery. *World Ingrid.*, Jan.-Feb.: 8-11.
- Hilliam, M. (1998). Functional foods in Europe. *World Ingrid.*, Mar.-Apr.: 45-47.
- Hilpert, H., Brüssow, H., Mietens, C., Sidoti, J., Herner, L. et Werchau, H. (1987). Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastro enteritis in infants. *J. Infect. Dis.*, 156,158-166.
- Hilpert, H. Gerber, H. Amster, H., Pahud, J.J., Ballabriga, A., Arcalis, L., Farriaux, F., de Peyer, E. et Nussle, D. (1977). Bovine milk immunoglobulins (Ig), their possible utilization in industrially prepared infant's milk formula *dans* Food and Immunology, Hambraeus, L., Hanson, L.A., MacFarlane, H. (eds). Almquist & Wiksell International, Stockolm, Sweden, pp. 182-196.
- Hollar, C.M., Parris, N., Hsieh, A. et Cockley, K.D. (1995). Factors affecting the denaturation and aggregation of whey proteins in heated whey protein concentrate mixtures. *J. Dairy Sci.*, 78: 260-267.
- Hollingsworth, P. (1995). Functional foods: fad or fact ? *Food Technol.*, 49(4): 32-34.

- Hollingsworth, P. (1996). Developing foods for the next millennium. *Food Technol.*, 50(6): 110-118.
- Houlton, S. (1997). The food, Pharma cross-over. *Int. Food Ingrid.*, 6: 45-46.
- Hunt, J.R. (1994). Nutritional products for specific health benefits - Foods, pharmaceuticals, or something in between ? *J. Am. Dietetic Assoc.*, 94(2): 151-153.
- Jelen, P. (1983). Reprocessing of whey and other dairy wastes for use as food ingredients. *Food Technol.*, Feb.: 81-84.
- Jelen, P. (1992). *Whey cheeses and beverages dans Whey and lactose processing*. Zadow, J.G. (ed), Elsevier Applied Science, London and New York, pp.171-193.
- Jelen, P., Currie, R. et Kadis, V.W. (1987). Compositional analysis of commercial whey drinks. *J. Dairy Sci.*, 70: 892-895.
- Jelen, P. et Rattray, W. (1995). Thermal denaturation of whey proteins *dans* Heat-induced changes in milk. *International dairy federation* (ed). chap.4, pp.67-85.
- Ju, Z.Y., Otte, J., Madsen, J.S. et Qvist, K.B. (1995). Effects of limited proteolysis on gelation and gel properties of whey protein isolate. *Int. Dairy J.*, 7: 71-78.
- Juto, S.S. et Ogra, P.L. (1978). Immunologic aspects of human colostrom and milk-II. Characteristics of lymphocyte reactivity and distribution of E-rosette forming cells at different times after onset of lactation. *J. Pediatrics*, 92 : 550-555.
- Kawakami, H. (1994). Studies on the effect of lactoferrin on iron absorption and its application. *Snow Brand R & D reports*, 101: 145-207.
- Kester, J.J. et Richardson, T. (1984). Modification of whey proteins to improve functionality. *J. Dairy Sci.*, 67: 2757-2774.
- Kevin, K. (1995). Functional foods : Designed for good health. *Food Process.*, 56(4): 72-77.
- Kinsella, J.E. Whitehead, D.M. et Brady, J. (1989). Milk proteins: possible relationships of structure and function *dans* *Developments in Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), Elsevier Sci. publishers, London & NY, chap. 2, pp.55-95.
- Klont, R. et Mannion, P. (1996). Foods with a claim. *World Ingrid.*, Oct.: 21-27.
- Klont, R. et Mannion, P. (1998). Nutritionals, the final frontier. *World Ingrid.*, Mar.-apr.: 39-44.

- Lahl, W.J. et Braun, S.D. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, 48(10): 68-71.
- Lahl, W.J. et Grindstaff, D.A. (1989). Spices and seasonings: hydrolyzed proteins. Proceedings of the 6th SIFST Symposium on Food Ingredients-Applications, Status and Safety, 27-29 April 1989, Singapore, pp.51-65. Singapore Institute of Food Science & Technology, Singapore.
- Lemoine, R. et Dunn, N. (1994). En Europe, au Japon... le boom des produits laitiers "santé". *Revue Laitière Française*, 541(Jui.-Aou.): 16-17.
- Le Toullec, M. (1995). Les aliments enrichis, une manne pour l'industrie. *Industries et Techniques*, 761(juin): 38-41.
- Lillford, P. (1995). Food research trends. *World Ingrid.*, Oct.-Nov.: 33-35.
- Madsen, J.S., Ahmt, T.O., Otte, J., Halkier, T. et Qvist, K.B. (1997). Hydrolysis of β -lactoglobulin by four different proteinases monitored by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Int. Dairy J.*, 7: 399-409.
- Mahmoud, M.I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.*, 48(10): 89-95.
- Mangino, M.E. (1992). Properties of whey protein concentrates *dans* Whey and lactose processing. J.G. Zadow (ed), Elsevier Appl. Sci., chap.7, pp.231-247.
- Mann, E.J. (1989). Whey utilisation - part 1. *Dairy Ind. Int.*, 54(8): 9-10.
- Martin, C. (1996). The elixir of life ? *Chem. Brit.*, 32(8): 34-36.
- McCue, N. (1996). Beverages fixate on fruit flavors. *Prepared Foods*, 165(7): 59-60.
- McIntosh, G.H. (1993). Dairy proteins : their influence on colon cancer risk. *Dairy Res. Develop. Corp. Nutrition Workshop Biographical Data (Abstract)*. Melbourne 18-19 Feb., pp. 14-15.
- Michalek, S.M., Gregory, R.L., Harmon, C.C., Katz, J., Richardson, G.J., Hilton, T., Filler, S.J. et McGhee, J.R. (1987). Protection of gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with bovine milk antibodies to streptococcus mutant. *Infect. Immun.*, 55: 2341-2347.
- Mincheva-Nilsson, L., Hammarström, M.L., Juto, P. et Hammarström, S. (1990). Human milk contains proteins that stimulate and suppress T lymphocyte proliferation. *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 463-469.

- Morel, F. (1995). *Aliments-Santé : une ère nouvelle ?* Process, 1103(mars): 10-11.
- Morr, C.V. (1989). *Whey proteins: Manufacture dans Developments in Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), Elsevier Sci. publishers, London & NY, chap. 6., pp.245-283.
- Morr, C.V. (1992). *Whey utilization dans Whey and lactose processing*. Zadow, J.G. (ed), Elsevier Applied Science, London and New York, pp.135.
- Mulvihill, D.M. (1992). *Production, functional properties and utilization of milk protein products dans Advanced Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), Elsevier Appl. Sci., London & NY. Vol. 1, chap.9, p.393.
- Mulvihill, D.M. et Donovan, M. (1987). *Whey proteins and their thermal denaturation - A review*. Irish J. Food Sci. Technol., 11(1): 43-75.
- Mulvihill, D.M. et Fox, P.F. (1989). *Physico-chemical and functional properties of milk proteins dans Developments in Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), Elsevier Sci. publishers, London & NY, chap. 4, pp.131-165.
- Mulvihill, D.M. et Kinsella, J.E. (1987). *Gelation of β -lactoglobulin: Effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels*. J. Food Sci., 53(1): 231-236.
- Mutilangi, W.A.M. et Kilara, A. (1985). *Functional properties of heat-denatured whey protein. I. Solubility*. Milchwissenschaft, 40(6): 338-340.
- Mutilangi, W.A.M., Panyam, D. et Kilara, A. (1995). *Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins*. J. Food Sci., 60(5): 1104-1109.
- Mutilangi, W.A.M., Panyam, D. et Kilara, A. (1996). *Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate*. J. Food Sci., 61(2): 270-274,303.
- Novo Nordisk bioindustrials Inc. (1995). *More efficient enzyme hydrolysis*. Prepared Foods, 164(8): 111.
- O'Carroll, P. (1998). *A sporting whey*. World Ingrid., Oct.: 54-57.
- Ogra, S.S. et Ogra, P.L. (1978). *Immunologic aspects of human colostrom and milk-II. Characteristics of lymphocyte reactivity and distribution of E-rosette forming cells at different times after onset of lactation*. J. Pediatrics, 92 : 550-555.
- Ohr, L.M. (1997). *Fortifying for the health of it*. Prepared Foods, 166(12): 55-60.
- Ohr, L.M. (1998). *Avoiding fortification fallout*. Prepared Foods, 167(2): 43-48.

- Otte, J., Ju, Z.Y., Skriver, A. et Qvist, K.B. (1996). Effect of limited proteolysis on the microstructure of heat-induced whey proteins gels at varying pH. *J. Dairy Sci.*, 79: 782-790.
- Paquin, P. et Gauthier, S. (1995). Branle-bas de combat dans l'industrie alimentaire. *Interface*, Nov.-déc.: 26-33.
- Panyam, D. et Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci. Technol.*, 7(4): 120-125.
- Papenburg, R., Bounous, G., Fleiszer, D. et Gold, P. (1990). Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *Tumor Biol.*, 11(3): 129-136.
- Park, K.H. et Lund, D.B. (1984). Calorimetric study of the thermal denaturation of β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, 67: 1699-1706.
- Parris, N., Hollar, C.M., Hsieh, A. et Cockley, K.D. (1997). Thermal stability of whey protein concentrate mixtures: aggregate formation. *J. Dairy Sci.*, 80: 19-28.
- Pedersen, B. (1994). Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technol.*, 48(10): 76,96-98.
- Pessen, H., Purcell, J.M. et Farrell, H.M.Jr. (1985). Proton relaxation rates in water in dilute solutions of β -lactoglobulin *dans* Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 828: 1-12.
- Pilley, G. (1996). Réflexions sur l'émergence d'un marché "nutraceutique". *Méd. et Nut.*, 32(2): 86-88.
- Pitts, E. (1995). Dairy ingredients: New opportunities in functional foods. *World Ingrid.*, Oct.-Nov.: 40-43.
- Potter, D. (1990). Functional foods - a major opportunity for the dairy industry ? *Dairy Ind. Int.*, 55(6): 16-17.
- Potter, D. (1995). Raising the health threshold. *World Ingrid.*, Oct.-Nov.: 54-55.
- Pszczola, D.E. (1992). The nutraceutical initiative : A proposal for economic and regulatory reform. *Food Technol.*, 46(4): 77-79.
- Roberfroid, M.B. (1998). Functional food science. *World Ingrid.*, Mar.-Apr.: 34-38.
- Robin, O., Turgeon, S. et Paquin, P. (1993). Functional properties of milk proteins *dans* *Dairy Science and Technology Handbook*. Y.H. Hui (ed), VCH Publishers Inc., Vol. 1, chap. 4, pp.289-329.

- Saif, L.J., Redman, D.R., Smith, K.L. et Theil, K.W. (1983). Passive immunity to bovine rotavirus in new born calves fed with colostrum supplements from immunized or non-immunized cows. *Infect. Immun.*, 41: 1118-1131.
- Salji, J. (1994). Foods for the future. *Food Sci. Technol. today*, 8(3): 139-143.
- Sanchez, C., Pouliot, M., Gauthier, S.F. et Paquin, P. (1997). Thermal aggregation of whey protein isolate containing microparticulated or hydrolyzed whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 2384-2392.
- Schmidt, R.H., Packard, V.S. et Morris, H.A. (1984). Effect of processing on whey protein functionality. *J. Dairy Sci.*, 67: 2723-2733.
- Sfiligoj, E. (1994). The nutraceuticals are here (if you take yours with milk)! *Beverage World*, 113(1576): 92-94.
- Shimada, K. et Cheftel, J.C. (1988). Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 36: 1018-1025.
- Sienkiewicz, T. et Riedel, C.L. (1990). Whey and whey utilization. Published by: Verlag Th. Mann., Germany, pp.164-188.
- Silvestre, M.P.C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.*, 60(2): 263-271.
- Sloan, A.E. (1995). Holy cow : what an opportunity ! *Food Technol.*, 49(9): 26.
- Sloan, A.E. et Stiedmann, M.K. (1996). Food fortification: From public-health solution to contemporary demand. *Food Technol.*, 50(6): 100-108.
- Stoeck, M., Ruegg, C. Miescher, S., Carrel, S., Cox, D., von Fliedner, V. et Alkan, S. (1989). Comparison of the immunosuppressive properties of milk growth factor and transforming growth factor B1 and B2. *J. Immunol.*, 143 : 3258-3265.
- Swartz, M.L. (1995). Milk proteins and hydrolysates in nutritional foods. *Food Marketing Technol.*, 9(2): 9-12.
- Tacket, C.O., Losonsky, G., Link, H., Hoang, Y., Guersy, P., Hilpert, H. et Levine, M.M. (1988). Protection of milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *New Eng. J. Med.* 318: 1240-1243.
- Toursel, P. (1996). Coup de fouet sur les soft-drinks. *Process*, 1115(Avr.): 43-44.
- Toursel, P. (1997). L'étiquette intelligente, mode. *Process*, 1131(Oct.): 30-31.

- Toursel, P. (1998). Une 2 CV avec un moteur de Ferrari. *Process*, 1136(Mars): 33-34.
- Tseng, E., Potter, S.M. et Picciano, M.F. (1990). Dietary protein source and plasma lipid profiles of infants. *Pediatrics*, 85 : 548-552.
- Tuohy, J.J., Fitzgerald, A. et Nash, P. (1988). Utilization of whey as a beverage. New whey-based fruit juice drink to be launched in Ireland. *Farm Food Res.*, 19(4): 8-10.
- van Moursel, L. (1997). Improving calcium and iron bioavailability. *Int. Food Ingredients*, 4: 44-46.
- Vojnovic, V., Ritz, M. et Vahcic N. (1993). Sensory evaluation of whey-based fruit beverages. *Die Nahrung*, 37(3): 246-251.
- Wasik, R. (1995). Nutraceuticals. *Food in Canada*, May: 33.
- Watson, D.L. (1990). Immunological activity of factors in colostrum and milk *dans* Joint convention papers, Gold coast, QLD, 6th-10th May, pp 81-83, Halais, C., Deeth, H., Fedrick, I., Jehne, C., Leith, G., MacFarlane, J., Paroz, P. (eds). The QLD branch of the Australian and New Zealand Institutes of Food Science and Technology Ltd.
- Wong, C.W. et Watson, D.L. (1995). Immuno modulatory effects of dietary whey proteins in mice, *J. Dairy Res.*, 62(2): 359-368.
- Xiong, Y.L., Dawson, K.A. et Wan, L. (1993). Thermal aggregation of β -lactoglobulin: Effect of pH, ionic environment, and thiol reagent. *J. Dairy Sci.*, 76: 70-77.
- Zhang, X. et Beynen, A.C. (1993). Lowering effect of dietary milk-whey proteins v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *Brit. J. Nutr.*, 70 (1) : 139-146.
- Ziajka, S., Dzwolak, W. et Zubel, J. (1994). The effect of processing variables on some properties of whey protein hydrolysates. *Milchwissenschaft*, 49(7): 382-384.