

**CLAUDINE THIERS**

**ÉTUDE DU FRACTIONNEMENT D'HYDROLYSATS TRYPSIQUES DE  
PROTÉINES DU LACTOSÉRUM PAR NANOFILTRATION**

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

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

**SEPTEMBRE 1999**

**© Claudine Thiers, 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.

0-612-44973-4

Canada

## **RÉSUMÉ**

Dans cette étude, nous avons tenté d'améliorer notre compréhension des mécanismes de fractionnement de mélanges peptidiques par nanofiltration. La première étape consistait à mettre au point deux hydrolysats trypsiques à partir de deux préparations différentes (commerciales et expérimentales) de  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) afin d'étudier l'impact de la composition de la matière première sur celle des hydrolysats obtenus. Les résultats ont montré que le choix de la matière première a peu d'influence sur le profil peptidique des hydrolysats totaux (HT) résultants. Par contre, la teneur en sels, en protéines et en lactose de la  $\beta$ -lg utilisée détermine directement la composition de l'HT ainsi que la proportion de chaque peptide. Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons étudié les mécanismes mis en jeu lors du fractionnement d'un hydrolysat trypsique de  $\beta$ -lg à différents pH. Les résultats ont confirmé que le pH avait une influence prédominante sur le flux de perméation et le colmatage, ainsi que sur la transmission des peptides, en déterminant non seulement leur charge, mais aussi leur solubilité.

**Claudine THIERS**

**Yves POULIOT (Ph. D)**  
Directeur

**Sylvie GAUTHIER (Ph.D)**  
Codirectrice

## **AVANT-PROPOS**

**Avant d'aborder l'essentiel de ce mémoire, je tiens à remercier Yves Pouliot, mon directeur de recherche, pour avoir su m'encourager tout au long de mes travaux avec bonne humeur et gentillesse. Je tiens à souligner sa disponibilité et la qualité de son encadrement.**

**Je remercie également ma codirectrice, Sylvie Gauthier, pour sa grande patience et ses conseils plus que pertinents dans les situations périlleuses. Sa belle énergie m'a permis de garder ma motivation face aux difficultés.**

**Un remerciement spécial pour Anita Garem du LRTL de l'INRA de Rennes ainsi que pour Michel Britten du CRDA de St-Hyacinthe qui m'ont accordé une aide précieuse.**

**Je tiens aussi à remercier les professionnels du département de STA qui nous aident toujours avec le sourire et nous permettent de profiter de leur expérience.**

**J'aimerais également remercier ma famille, et particulièrement Valérie et Éric qui étaient à mes côtés tout au long du périple. Ce mémoire est dédié à mes parents qui, malgré la distance, m'ont entourée de tout leur amour et dont la confiance m'a apporté beaucoup de courage.**

**Je souhaite également remercier mes amis Martin, Arnaud et Aldo pour leur présence, leur soutien et tous les fous rires que nous avons partagés. Enfin, je remercie particulièrement Éric L. non seulement pour son amitié mais aussi pour son aide généreuse.**

# TABLE DES MATIÈRES

	<b>PAGE</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>II</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>IX</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	<b>4</b>
1. LA $\beta$ -LACTOGLOBULINE .....	5
1.1. <i>Caractéristiques structurales et rôle biologique</i> .....	5
1.2. <i>Propriétés physico-chimiques</i> .....	8
2. PROCÉDÉS D'OBTENTION DE LA $\beta$ -LACTOGLOBULINE.....	10
3. AMÉLIORATION DES PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DE LA $\beta$ -LACTOGLOBULINE PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE.....	12
4. FRACTIONNEMENT D'HYDROLYSATS ENZYMATIQUES PAR PROCÉDÉS À MEMBRANES.....	14
4.1. <i>Présentation des principaux procédés</i> .....	14
4.2. <i>Principes de séparation en nanofiltration</i> .....	19
4.3. <i>État des connaissances sur le fractionnement d'hydrolysats                 protéiques par UF et NF</i> .....	20
4.3.1. <i>Travaux portant sur l'UF</i> .....	20
4.3.2. <i>Travaux portant sur la NF</i> .....	23

<b>BUT ET OBJECTIFS.....</b>	<b>27</b>
------------------------------	-----------

<b>CHAPITRE 2 : IMPACT DES CARACTÉRISTIQUES DE COMPOSITION DE LA MATIÈRE PREMIÈRE SUR CELLES DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES OBTENUS .....</b>	<b>29</b>
---	-----------

1. INTRODUCTION .....	30
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	32
2.1. Préparation de la $\beta$ -lg expérimentale.....	32
2.2. Hydrolyse trypsique de la $\beta$ -lg expérimentale et commerciale .....	33
2.3. Méthodes analytiques.....	34
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	36
3.1. Caractérisation des substrats et des hydrolysats totaux.....	36
3.2. Effet du substrat sur le profil peptidique des hydrolysats totaux.....	38
4. CONCLUSION.....	44
5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45

<b>CHAPITRE 3 : ÉTUDE DU FRACTIONNEMENT D'UN HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE <math>\beta</math>-LACTOGLOBULINE PAR NANOFILTRATION .....</b>	<b>47</b>
---	-----------

1. INTRODUCTION .....	48
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	51
2.1. Préparation de l'hydrolysat trypsique de $\beta$ -lactoglobuline.....	51
2.2. Essais de nanofiltration .....	52
2.2.1. Procédures des essais de filtration .....	52
2.2.2. Calculs.....	53
2.3. Méthodes analytiques.....	54
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	55
3.1. Effet du pH sur la perméabilité membranaire .....	55
3.2. Effet du pH sur la transmission du soluté.....	57
4. CONCLUSION.....	58
5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	63

**BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE .....67**

**CONCLUSION GÉNÉRALE .....65**

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>CHAPITRE 1 :</b>	<b>PAGE</b>
<i>TABLEAU 1 :</i> Comparaison de différents procédés de séparation membranaire.....	15
<i>TABLEAU 2 :</i> Exemples d'applications de la nanofiltration.....	18
<b>CHAPITRE 2 :</b>	
<i>TABLEAU 1 :</i> Composition en protéines des poudres de $\beta$ -lactoglobuline expérimentale ( $\beta$ -lgE) et de $\beta$ -lactoglobuline commerciale ( $\beta$ -lgC).....	40
<i>TABLEAU 2 :</i> Composition des trois hydrolysats (HTE, HTC, HT <i>Bipro</i> ) obtenus par hydrolyse trypsique.....	41
<b>CHAPITRE 3 :</b>	
<i>TABLEAU 1 :</i> Gradient d'élution des analyses d'HPLC.....	55
<i>TABLEAU 2 :</i> Valeurs des flux de perméation à l'eau ( $J_w$ ), des flux de perméation ( $J_f$ ), des résistances membranaires hydrauliques de la membrane propre ( $R_m$ ) et de colmatage total ( $R_f$ ) en fonction du pH.....	59



**TABLEAU 3 :** Évolution en fonction du pH du rapport R : «aire totale des chromatogrammes du perméat / aire totale des chromatogrammes de la solution de départ» obtenus par RP-HPLC en C<sub>18</sub> ..... 59

## LISTE DES FIGURES

<b>CHAPITRE 1 :</b>	<b>PAGE</b>
<i>FIGURE 1 :</i> Structure primaire de la $\beta$ -lactoglobuline B indiquant la substitution des résidus d'acides aminés dans le variant A .....	6
<i>FIGURE 2 :</i> Représentation schématique de la structure tertiaire de la $\beta$ -lactoglobuline, indiquant la localisation d'une molécule de rétinol.....	7
<i>FIGURE 3 :</i> Représentation schématique des flux convectifs ( $J_c$ ) et électromigratifs ( $J_e$ ) du co-ion et du contre-ion.....	21
<b>CHAPITRE 2 :</b>	
<i>FIGURE 1 :</i> Distribution des poids moléculaires (%) des composés protéiques du HTE, HTC et du HT <i>Bipro</i> .....	42
<i>FIGURE 2 :</i> Profils chromatographiques (RP-HPLC) du HTE (a), du HTC (b) et du HT <i>Bipro</i> (c).....	43

**CHAPITRE 3 :**

<i>FIGURE 1 :</i> Profils chromatographiques (RP-HPLC) de la solution de départ à pH 3 (a) et du perméat à pH 3 (b).....	60
<i>FIGURE 2 :</i> Profils chromatographiques (RP-HPLC) de la solution de départ à pH 9 (a) et du perméat à pH 9 (b).....	61
<i>FIGURE 3 :</i> Profils chromatographiques (RP-HPLC) de la solution de départ à pH 11 (a) et du perméat à pH 11 (b).....	63

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Autrefois considéré comme un simple résidu de la fabrication fromagère, le lactosérum était principalement utilisé en nutrition animale. Les recherches effectuées au cours des vingt dernières années ont apporté une meilleure connaissance des propriétés des protéines qu'il contient et ont permis l'émergence de nouvelles technologies permettant de les fractionner. Ainsi ce sous-produit a pu accéder au statut de produit à haute valeur ajoutée. Les protéines du lactosérum sont de nos jours commercialisées sous forme de concentrés (35-75% de protéines), d'isolats (>90% de protéines) ou encore de fractions protéiques distinctes. Elles trouvent des applications industrielles variées dans les domaines de la pharmacologie, des cosmétiques et surtout de l'agroalimentaire. En effet, grâce à leurs propriétés nutritionnelles et fonctionnelles si particulières, les concentrés (CPL) et les isolats (IPL) de protéines de lactosérum occupent une place de choix dans la gamme des ingrédients protéiques alimentaires (Kinsella et al., 1989).

Du point de vue nutritionnel les protéines du lactosérum sont de très haute qualité. Leur richesse en acides aminés essentiels tels que la lysine, la méthionine et le tryptophane répond à toutes les exigences de la nutrition humaine. Elles sont par conséquent considérées comme des protéines idéales en diététique et couramment utilisées dans les formules de lait pour nourrissons, les diètes spécialisées à usage thérapeutiques et les boissons pour sportifs (Maubois et Léonil, 1989). En outre, en plus de leur qualité nutritionnelle exceptionnelle, les protéines lactosériques sont une source de peptides bioactifs (Xu, 1998). Bien qu'elles suscitent moins d'intérêt dans ce domaine que les caséines, elles ont retenu l'attention de plusieurs auteurs. Chiba et Yoshikawa (1986) par exemple, ont identifié deux peptides à activité opioïde : l' $\alpha$ -lactorphine dans les fragments 50-53 de l' $\alpha$ -lactalbume ( $\alpha$ -la) bovine et humaine, ainsi que la  $\beta$ -lactorphine dans le fragment 102-105 de la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) bovine. Un autre peptide opioïde, la sérorphine, a été isolé du fragment 399-404 de la sérum albumine bovine (Tani et al., 1994). Yamauchi (1992) a montré par ailleurs l'existence de la  $\beta$ -lactotensine, fragment

146-149 de la  $\beta$ -lg, capable de provoquer la contraction du muscle longitudinal de l'iléum du cobaye. Enfin, le tripeptide Ile-Pro-Ala correspondant au fragment 78-80 de la  $\beta$ -lg possède une forte activité antihypertensive (Abubakar et al., 1998). Les protéines du lactosérum contiennent donc dans leur structure primaire des zones correspondant à des séquences peptidiques physiologiquement actives.

Au niveau des propriétés fonctionnelles, les CPL et les IPL présentent une solubilité élevée avec une faible capacité d'adsorption d'eau (Swaisgood, 1982). Leurs propriétés thermogélifiantes sont bonnes et dépendent principalement de l'aptitude individuelle de la  $\beta$ -lactoglobuline à gélifier. Les caractéristiques physiques des gels obtenus sont par ailleurs étroitement liées au pH et à l'environnement ionique du milieu (Gault et Fauquant, 1992). Concernant les propriétés tensio-actives, les études sont nombreuses et emploient des méthodes d'évaluation très variées débouchant parfois sur des résultats contradictoires. De façon générale, leur adsorption à l'interface est plus difficile que pour les caséines, et ce en raison de leur structure globulaire stabilisée par des ponts disulfures et de leur nature amphiphile moins prononcée (Kinsella et al., 1989; Turgeon et Gauthier, 1990; Turgeon et al., 1991; Gauthier et al., 1993). Par conséquent leur capacité à stabiliser des émulsions ou des mousses est réduite, ce qui limite leur utilisation comme ingrédient alimentaire (Morr, 1979). En outre, il faut noter que la plupart de ces études ne font pas de distinction entre les propriétés fonctionnelles des CPL et de la  $\beta$ -lactoglobuline individualisée. Étant la plus abondante et la plus réactive des protéines sériques, on considère en effet que son comportement fonctionnel est reflété par celui de l'ensemble du système.

L'hydrolyse enzymatique est une technique utilisée depuis plusieurs années dans le but de modifier les propriétés fonctionnelles, nutritionnelles et biologiques des protéines. Elle permet d'augmenter la digestibilité et la solubilité des protéines, tout en diminuant leur allergénicité et en libérant les peptides bioactifs contenus dans leur structure primaire, mais surtout, elle modifie significativement leurs propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes (Fox et al., 1982). À ce jour, de nombreuses études basées sur cette technique relativement douce ont été réalisées en vue d'obtenir de nouveaux peptides hautement fonctionnels et/ou bioactifs. Le contrôle du degré d'hydrolyse est dans ce cas un facteur

essentiel car une hydrolyse totale s'accompagne de la perte de ces propriétés (Kinsella et al., 1989). L'efficacité de l'hydrolyse dépend aussi de la composition et de l'état physico-chimique du substrat puisque les caractéristiques de composition de la matière première ont un impact sur celles des hydrolysats obtenus. Il est donc pertinent de comparer différentes source de protéines lors de la mise au point d'un hydrolysat. D'autre part, les hydrolysats protéiques étant des mélanges complexes d'acides aminés et de peptides hétérogènes en taille et en charge, il est essentiel de contrôler leur composition afin d'obtenir une activité maximale et reproductible. Une étape préliminaire de fractionnement et/ou de purification de ces hydrolysats est par conséquent souhaitable. Le recours à l'ultrafiltration (UF) permet de séparer aisément le substrat et l'enzyme des acides aminés, peptides et sels minéraux. Par contre, cette technique de fractionnement basée sur l'exclusion stérique n'est pas suffisamment sélective pour séparer entre elles des espèces de tailles peu différenciées tels que les peptides, les acides aminés ou les minéraux. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés au procédé de nanofiltration (NF), capable de séparer des solutés de faible masse moléculaire selon une double sélectivité basée à la fois sur la taille et la charge. En effet, cette technique de séparation par membranes utilisant des matériaux polymériques chargés négativement, permet de séparer des constituants de masses moléculaires voisines mais dont les caractéristiques de charge diffèrent. Bien que les mécanismes régissant le fractionnement par NF ne soient toujours pas élucidés, il a déjà été démontré que certains paramètres physico-chimiques tels que le pH et la force ionique influençaient la séparation de mélanges peptidiques.

Dans cette optique, nous avons mis au point et comparé deux hydrolysats tryptiques de  $\beta$ -lactoglobuline (un à partir de  $\beta$ -lg commerciale et un autre à partir de  $\beta$ -lg purifiée au laboratoire), pour ensuite les fractionner par NF. Le but de ce travail était d'améliorer notre compréhension des mécanismes de fractionnement des mélanges peptidiques par nanofiltration et ce, en vue de produire de grandes quantités de peptides hautement fonctionnels.

## **CHAPITRE 1**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

## **1. LA $\beta$ -LACTOGLOBULINE**

### **1.1. Caractéristiques structurales et rôle biologique**

Les protéines du lactosérum sont définies comme étant les protéines du lait qui demeurent solubles après la coagulation des caséines à pH 4.6 et 20°C (Eigel et al., 1984). Elles représentent 20% des protéines totales du lait soit une concentration maximale dans le lactosérum de 0.8% (p/v). Elles comprennent la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg), l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -la), la sérum albumine bovine (BSA), les immunoglobulines (Ig), ainsi qu'une faible proportion (8%) de fragments de caséines appelés protéoses peptones et quelques protéines mineures. Elles ont été abondamment décrites dans la littérature et les caractéristiques structurales et physico-chimiques des principales protéines du lactosérum sont connues (Eigel et al., 1984; Fox et al., 1982; Kinsella et al., 1989)

La  $\beta$ -lactoglobuline est la protéine majeure du lactosérum. Elle a été isolée du lait bovin pour la première fois en 1934 par Palmer. Sa concentration dans le lactosérum bovin varie de 2 à 4 g/L ce qui correspond à 60% de la totalité des protéines sériques (Swaisgood, 1982). Sept variants génétiques ont été identifiés à ce jour, les variants A et B étant les plus fréquents. Cette petite protéine globulaire est constituée de 162 acides aminés dont 5 résidus lysine (18 400 Da), avec un groupement sulfhydryle libre en position 119 ou 121 (Figure 1). Sa structure est stabilisée par la présence de deux ponts disulfures entre les résidus CYS<sub>66</sub>-CYS<sub>160</sub> ainsi que CYS<sub>106</sub>-CYS<sub>119</sub> ou CYS<sub>106</sub>-CYS<sub>121</sub> (Eigel et al., 1984; Kinsella, 1988). De nombreuses études reposant sur des techniques optiques ont permis d'estimer que sa structure secondaire comprend 15% d'hélice  $\alpha$ , 51% de feuillets  $\beta$ , 17% de courbure  $\beta$  et 17% de structure désordonnée (Susi et Byler, 1986; Casal et al., 1988). Au niveau de sa structure tertiaire (figure 2), le cœur de cette protéine est constitué de 9 feuillets  $\beta$  antiparallèles enroulés en un calice hydrophobe appelé tonneau  $\beta$ , avec à sa surface une courte hélice  $\alpha$  à trois tours (Papiz et al., 1986; Monaco et al., 1987).



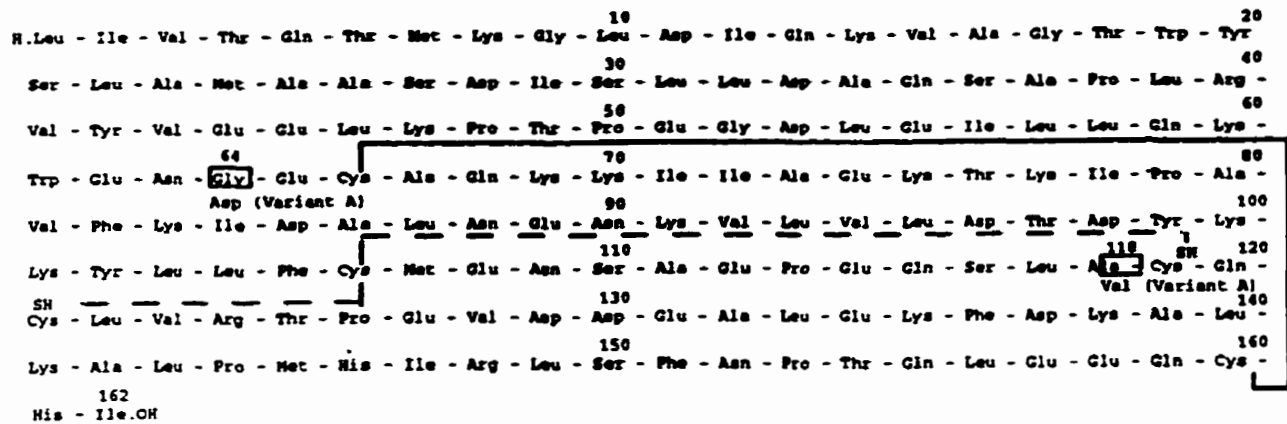
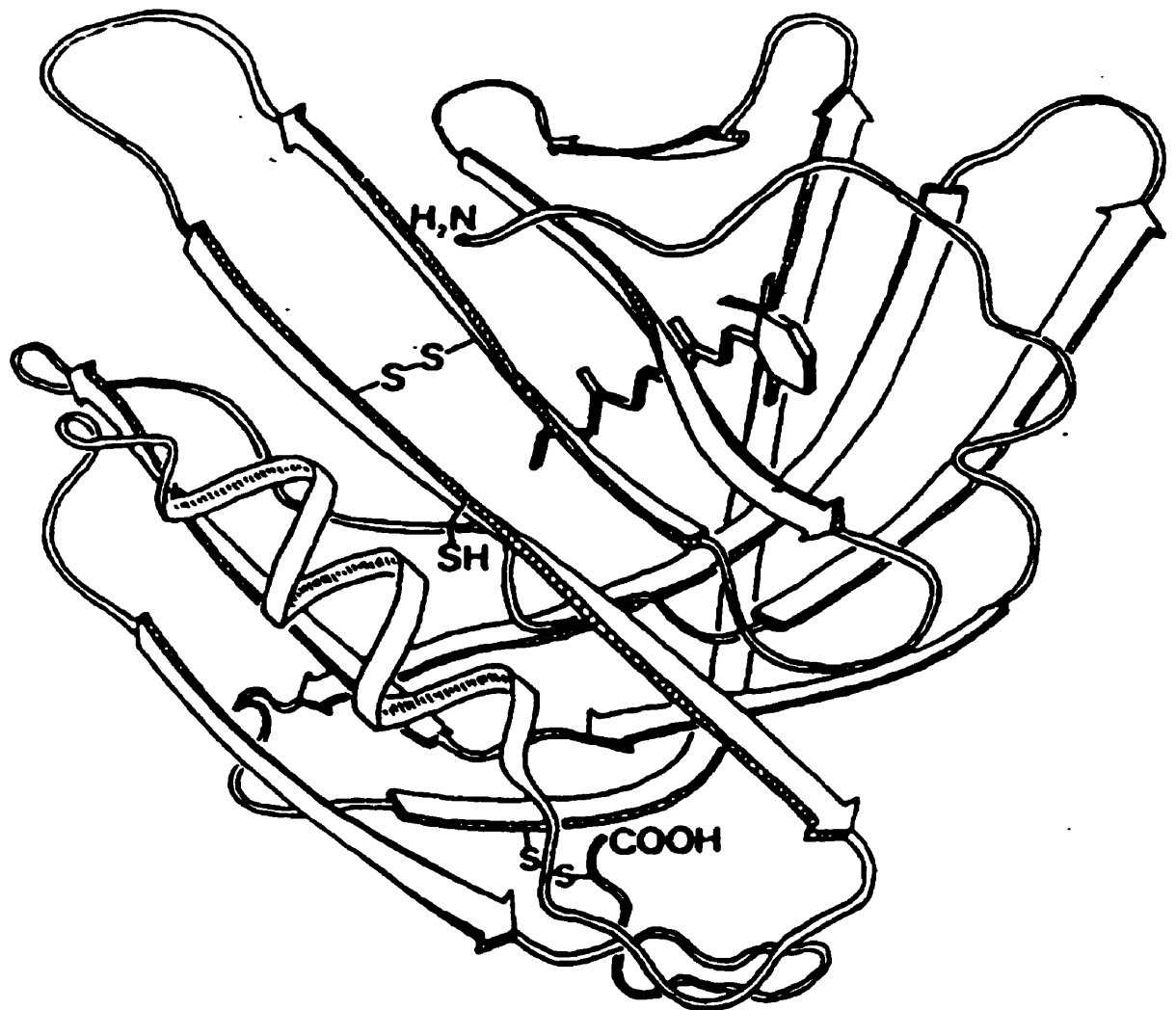


FIGURE 1 :

Structure primaire de la  $\beta$ -lactoglobuline B indiquant la substitution des r sids d'acides aminés dans le variant A (Eigel et al.,1984)



**FIGURE 2 :**

**Représentation schématique de la structure tertiaire de la  $\beta$ -lactoglobuline, indiquant la localisation d'une molécule de rétinol (Papiz et al., 1986)**

Bien qu'elle soit étudiée depuis près d'un demi-siècle on ne connaît toujours pas sa fonction *in vivo* avec précision. Il est même envisageable que la  $\beta$ -lactoglobuline ait perdu sa fonction biologique au cours de l'évolution et quelle ait été conservée uniquement pour ses qualités nutritives (Sawyer et al., 1998). Par contre, on sait avec certitude que *in vitro* cette protéine interagit fortement avec le rétinol au niveau du tonneau  $\beta$  (Fugate et Song, 1980; Monaco et al., 1987; Chen et al., 1993; Cho et al., 1994). Elle est capable de lier une molécule de rétinol par monomère. De plus, sa ressemblance avec la RBP (Retinol Binding Protein) et d'autres protéines de la super famille des protéines liant des petites molécules hydrophobes, laisse penser qu'une des fonctions physiologiques de la  $\beta$ -lg serait le transport du rétinol. Elle est aussi capable de fixer par exemple l'hémine, l'ellipticine, certains composés aromatiques et surtout des acides gras (Dufour et al., 1993). Cette dernière faculté lui permet de stimuler la lipase gastrique chez les ruminants en éliminant du site de réaction les acides gras libres qui inhibent cette enzyme. Selon un modèle proposé par Sawyer et al. (1998), le site capable de lier les acides gras serait une sorte de faille située entre les trois tours effectués par l'hélice  $\alpha$  à la surface du tonneau  $\beta$ . Un troisième site au niveau de la région repliée Trp<sub>19</sub>/Arg<sub>124</sub> serait responsable de la fixation des composés aromatiques.

## 1.2. Propriétés physico-chimiques

Dépendamment de la force ionique, de la température, de sa concentration mais surtout du pH, la  $\beta$ -lactoglobuline existe sous différents états conformationnels. À pH 2 où les forces électrostatiques répulsives sont importantes, on la trouve sous forme de monomère. Entre pH 2.0 et 3.5 des interactions électrostatiques et hydrophobes s'établissent et la molécule se dimérise. À des valeurs comprises entre 3.5 et 5.2, il y a tétramérisation des dimères avec pour conséquence l'apparition d'octamères. À pH physiologique (entre 5.2 et 6.7) et à température pièce, la  $\beta$ -lg existe principalement sous forme de dimère (deWit, 1989). Différents changements conformationnels commencent à apparaître dans la région neutre et alcaline et à pH 8.0 une dénaturation irréversible débute. Elle est suivie d'une

polymérisation conduisant à l'agrégation (Casal et al., 1988). À pH 13, cette dénaturation par polymérisation est totale et implique l'oxydation du groupement thiol libre et la rupture des ponts disulfures (Swaisgood, 1982). Ces mêmes réactions se trouvent aussi impliquées dans les phénomènes de dénaturation thermique que subit la  $\beta$ -lactoglobuline (Reddy et al., 1988).

La structure globulaire compacte de la  $\beta$ -lactoglobuline, avec ses deux ponts disulfures et son groupement thiol libre, lui confère une plus grande sensibilité à la chaleur que les caséines. Jusqu'à 70°C elle subit des modifications conformationnelles réversibles aboutissant à une perte de la structure tertiaire et à une exposition des groupements hautement réactif SH et  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> (Kella et Kinsella, 1988). À des températures supérieures, elle encourt une dénaturation irréversible et une polymérisation par formation de liaisons disulfides intermoléculaires (Reddy et al., 1988). Ces phénomènes de dénaturation s'accompagnent d'une perte des propriétés biologiques et fonctionnelles: les protéines dénaturées deviennent presque insolubles et ne peuvent plus diffuser à l'interface, perdant du même coup leur pouvoir émulsifiant et moussant (Bernal et Jelen, 1985; Dybing et Smith, 1991; Morr et Ha, 1993). Étant donné que le comportement thermolabile de la  $\beta$ -lg traduit celui de l'ensemble du système lactosérique (de Wit et Hontelez-Backx, 1981), les traitements tels que la pasteurisation ou encore la stérilisation qui sont courants en industrie ont un effet négatif sur tous les produits contenant des protéines du lactosérum (de Wit et Klarenbeek, 1981). Les problèmes pratiques rencontrés lors de leur utilisation comme ingrédients laitiers sont donc très importants.

D'autre part, la  $\beta$ -lactoglobuline, avec ses 5 résidus lysine, est particulièrement sensible à la lactosylation. Cette interaction protéine-lactose constitue la première étape de la réaction de Maillard et peut se produire à des températures relativement basses. Elle implique un sucre réducteur et un composé aminé libre faisant de la lysine le principal site de liaison sur la molécule de  $\beta$ -lg. Très souvent désigné sous le terme général de brunissement non enzymatique, la réaction de Maillard regroupe un ensemble complexe de réactions dont les principales étapes sont : une glycosylation non enzymatique de la protéine suivie, si le traitement thermique se poursuit, par une cascade de réactions incluant la racémisation

d'acides aminés L en D et la formation de divers composés (substances aromatiques, fururals, cétosamines et aldosesamines). Enfin, une polymérisation des substances formées précédemment aboutit à la formation de composés volatiles et odorants ainsi qu'à des pigments bruns ou noirs. Léonil et al. (1997) ont montré que lors de traitements thermiques modérés (inférieurs à 70°C), la  $\beta$ -Lg se combine au lactose et que sous forme de monomère elle est capable de fixer plusieurs molécules de glucose. Les résidus de lysine, acides aminés essentiels impliqués dans la réaction, ne sont alors plus disponibles d'un point de vue nutritionnel, les enzymes digestives étant incapables de les métaboliser sous cette forme. De plus, même si la présence de lactose dans les CPL est réduite, la réaction se produit à un taux suffisant à température pièce pour donner un brunissement détectable et une dégradation de la saveur (Morr et Ha, 1993).

## **2. PROCÉDÉS D'OBTENTION DE LA $\beta$ -LACTOGLOBULINE**

L'accumulation des connaissances sur les propriétés de chacune des protéines du lactosérum a permis d'envisager leur séparation en vue d'utilisations et de valorisations différenciées. Dans ce but, de nombreuses méthodes ont été proposées pour séparer au niveau du laboratoire les différents constituants protéiques du lactosérum. La plupart ne sont pas extrapolables au plan industriel parce que longues, complexes, inadaptées au traitement de grands volumes ou bien encore coûteuses en énergie et de faible rendement. D'autres encore utilisent des traitements thermiques intenses (Nielsen et al., 1973) ou des pH supérieurs à 7 (Harris et Yoell, 1985) qui sont, comme nous venons de le voir, des conditions très dénaturantes. Bien que simples et efficaces, les méthodes dites de «salting out», basées sur l'utilisation de sels pour séparer sélectivement les protéines par précipitation, limitent l'utilisation ultérieure du produit en alimentation (Mailliart et Ribadeau-Dumas, 1988). Pour cette raison, ces techniques ont été améliorées en introduisant des procédés de diafiltration et de dialyse afin d'éliminer ces sels (Maté et Krochta, 1994; Caessens et Gruppen, 1997). Les méthodes chromatographiques permettent quant à elles d'obtenir de grandes quantités de produit avec un degré de pureté de l'ordre

de 97 % tout en maintenant des conditions douces (Kristiansen et al., 1998). Cependant, l'utilisation de la chromatographie nécessite au départ un investissement élevé et amène le plus souvent une dilution des protéines éluées, d'où un accroissement des coûts de concentration et de séchage. Une autre approche intéressante consiste à exploiter la résistance de la  $\beta$ -lg à l'hydrolyse par la pepsine (Kinekawa et Kitabatake, 1996). En effet, les autres protéines sériques étant toutes hydrolysées par cette enzyme, il est possible de les séparer par ultrafiltration : la  $\beta$ -lg reste intacte dans le rétentat tandis que les autres, sous forme de peptides, traversent la membrane et sont éliminées dans le perméat.

Enfin, Léonil et al. (1997) ont mis un point un procédé peu coûteux permettant de purifier de grandes quantités de  $\beta$ -lg tout en évitant le phénomène de lactosylation présenté dans la section précédente. Basée sur une étude préliminaire de Pearce (1983), cette méthode repose sur la précipitation sélective de l' $\alpha$ -lactalbumine à bas pH sous traitement thermique modéré. Des études préliminaires (Pierre et Fauquant, 1986; Bramaud et al., 1997 a; Tupasela et al., 1997) ont permis de déterminer les conditions de co-précipitation de l' $\alpha$ -la, de la BSA et des Igs les moins dénaturantes pour la  $\beta$ -lg (température, durée du chauffage, pH, teneur en protéines et en solides totaux). Le contrôle de la concentration en calcium libre permet d'optimiser cette étape car, lorsque cette teneur est réduite, le phénomène de précipitation est amplifié. Dans cette optique, l'utilisation d'acide citrique comme agent complexant du calcium, permet simultanément d'ajuster le pH et de réduire cette concentration en calcium ionique. La séparation des différentes fractions jusqu'à purification de la  $\beta$ -lg se fait par centrifugation, cette méthode étant plus efficace que la microfiltration (Bramaud et al., 1997 b).

### **3. AMÉLIORATION DES PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DE LA $\beta$ -LACTOGLOBULINE PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE**

Plusieurs procédés ont été mis au point pour tenter d'améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum et ce, dans le but d'augmenter leur utilisation comme ingrédients alimentaires. Contrairement aux différents procédés chimiques, physiques ou génétiques existants, la méthode enzymatique offre des conditions réactionnelles douces (Adler-Nissen, 1986). Cette réaction, catalysée par des protéases, provoque la rupture des liens peptidiques ce qui conduit à la libération de peptides et d'acides aminés en diverses proportions. La cinétique de la réaction est généralement suivie par la mesure du degré d'hydrolyse (DH) défini comme le nombre de liens peptidiques hydrolysés par rapport au nombre total de liens existants dans une protéine donnée (Adler-Nissen, 1986). Le choix des enzymes, utilisées seules ou en combinaison, permet selon leur spécificité de modifier le profil peptidique obtenu.

L'hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum entraîne plusieurs répercussions sur le plan nutritionnel. Tout d'abord, le fait de diminuer le poids moléculaire des protéines peut réduire leur allergénicité. En même temps, leur digestibilité va augmenter, les petits peptides de 2 à 7 acides aminés étant plus facilement assimilables que les protéines natives (Reddy et al., 1988). Enfin, l'activité des protéases va permettre de libérer et donc d'activer les peptides bioactifs dissimulés dans la structure primaire de la protéine. Le fait de couper la chaîne moléculaire de protéines globulaires telle que la  $\beta$ -lg permet aussi de modifier leur structure secondaire ainsi que leur hydrophobicité, et par conséquent leurs propriétés fonctionnelles. On peut de cette façon diminuer leur viscosité, augmenter leur solubilité et modifier significativement leurs propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes (Fox et al., 1982; Adler et Nissen, 1986). Ceci s'explique par le fait que les peptides libérés par protéolyse ont une structure secondaire plus lâche et diffusent plus rapidement aux interfaces tout en étant moins efficaces que les protéines à diminuer la tension de surface (Turgeon et al., 1991). Par ailleurs, Turgeon et al. (1992) ont montré que l'on obtient de bonnes propriétés interfaciales avec des peptides suffisamment longs et flexibles pour

permettre à leurs zones hydrophobes de se regrouper. Les peptides 21-40 et le 41-60, caractérisés par un poids moléculaire et une hydrophobicité élevés, se sont avérés responsables de l'amélioration des propriétés émulsifiantes de la  $\beta$ -lg suite à son hydrolyse par la trypsine.

En raison de sa structure globulaire compacte, la  $\beta$ -lactoglobuline est la protéine du lait la plus résistante à la protéolyse. Elle est notamment insensible à l'action de la pepsine mais possède par contre 17 sites théoriques de coupure par la trypsine. Cette enzyme est une endoprotéase pancréatique d'une spécificité très stricte dont les sites de coupures se limitent à deux acides aminés basiques : la lysine et l'arginine. A cause de problèmes d'accessibilité, certains liens peptidiques de la  $\beta$ -lg sont cependant difficilement coupés. C'est le cas par exemple de la liaison LYS<sub>77</sub>-ILE<sub>78</sub> ou encore LYS<sub>135</sub>-PHE<sub>136</sub> (Dalgarrondo et al., 1990). Aussi, le lien LYS<sub>47</sub>-PRO<sub>48</sub> ne serait pas hydrolysé dû à l'encombrement stérique causé par le résidu proline en position 48 (Hirs et al., 1956). A l'inverse, une coupure non spécifique au niveau du lien TYR<sub>20</sub>-SER<sub>21</sub> a été observée par plusieurs auteurs (Dalgarrondo et al., 1990; Turgeon et al., 1992).

En vue d'obtenir de nouveaux peptides hautement fonctionnels et/ou bioactifs il est essentiel de contrôler le degré d'hydrolyse. Il existe en effet un degré d'hydrolyse optimal spécifique à la nature de la protéine, à l'enzyme utilisée et à la propriété étudiée au delà duquel l'amélioration fonctionnelle est perdue (Kinsella et al., 1989). D'autre part, les hydrolysats protéiques étant des mélanges complexes d'acides aminés et de peptides hétérogènes en taille et en charge, il est essentiel de contrôler leur composition afin d'obtenir une activité maximale et reproductible. Une étape préliminaire de fractionnement et/ou de purification de ces hydrolysats est par conséquent souhaitable.



## **4. FRACTIONNEMENT D'HYDROLYSATS ENZYMATIQUES PAR PROCÉDÉS À MEMBRANES**

### **4.1. Présentation des principaux procédés**

Différents procédés de séparation à membranes peuvent être utilisés afin de fractionner, concentrer ou purifier des solutions diluées tels que les hydrolysats. Tous ont en commun le fait que la séparation s'effectue via une membrane poreuse jouant le rôle de barrière sélective entre deux phases homogènes (Mulder, 1997). Le passage à travers la membrane se fait sous l'action d'une force due à une différence de pression et/ou de concentration de part et d'autre de cette membrane. Le choix de la membrane en terme de taille et de distribution des pores repose sur la masse moléculaire et les propriétés chimiques (solubilité, charge) du soluté. Dépendamment du type de membrane employé, on distingue différents procédés tels que la microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse dont la taille des pores va en décroissant (tableau 1).

Dans le cas de la microfiltration (MF), la structure membranaire peut être de deux types. Si son épaisseur (10 à 150  $\mu\text{m}$ ) est homogène et contribue au complet à la rétention du soluté (couche active), on parlera de structure symétrique. Si, par contre, elle est constituée d'une fine couche active dense de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$  reposant sur un support poreux inactif (50-150  $\mu\text{m}$ ), on parlera alors de structure asymétrique. Le flux étant inversement proportionnel à l'épaisseur de la couche active, l'intérêt commercial des membranes asymétriques est évident. Elles sont pour cette raison largement majoritaires. La taille des pores en microfiltration varie de 10 à 0.05  $\mu\text{m}$ . La sélectivité repose sur la taille des particules et le principe de séparation s'apparente à un effet de tamis (exclusion stérique). La pression osmotique est négligeable d'où un flux directement proportionnel à la pression appliquée (toujours inférieure à 2 bars). Ce procédé permet de séparer de larges particules (> 0.1  $\mu\text{m}$ ) du liquide dans lequel elles se trouvent en suspension ou en émulsion. Une des principales applications est la stérilisation ou la clarification de boissons et produits pharmaceutiques.

**TABLEAU 1 : Comparaison de différents procédés de séparation membranaire (Mulder, 1997)**

<b>Microfiltration</b>	<b>ultrafiltration</b>	<b>nanofiltration/ osmose inverse</b>
séparation de particules	séparation de macromolécules (bactéries, levures)	séparation de solutés de faible PM (sels, glucose, lactose, micropolluants)
pression osmotique négligeable <sup>a</sup>	pression osmotique négligeable <sup>a</sup>	pression osmotique élevée ( $\approx 1 - 25$ bars)
pression appliquée faible ( $< 2$ bars)	pression appliquée faible ( $\approx 1 - 10$ bars)	pression appliquée élevée ( $\approx 10 - 60$ bars)
structure symétrique structure asymétrique	structure asymétrique	structure asymétrique
épaisseur de couche active symétrique $\approx 10 - 150 \mu\text{m}$ asymétrique $\approx 1 \mu\text{m}$	épaisseur de couche active actuelle $\approx 0.1 - 1.0 \mu\text{m}$	épaisseur de couche active actuelle $\approx 0.1 - 1.0 \mu\text{m}$
séparation basée sur la taille des particules	séparation basée sur la taille des particules	séparation basée sur les différences de solubilité et de diffusion

<sup>a</sup> : en absence d'une couche de polarisation

L'ultrafiltration (UF) est très proche de la microfiltration en ce sens qu'elle repose sur les mêmes principes de séparation (exclusion stérique, pression osmotique négligeable). Les membranes sont toutes de type asymétrique avec une épaisseur de la couche active variant de 0.1 à 1.0  $\mu\text{m}$ . La principale différence repose sur la taille des pores qui se situe entre 1 et 100 nm. La résistance hydrodynamique est par conséquent plus forte qu'en MF, ce qui nécessite l'application de pressions supérieures soit 1 à 10 bars. Le domaine de séparation touche cette fois les macromolécules et ce procédé est utile lorsque l'on souhaite séparer des composés de hauts poids moléculaires de composés de bas poids moléculaires. Les applications concernent aussi bien le domaine laitier et de l'agroalimentaire en général, que l'industrie pharmaceutique, textile, chimique, métallurgique ou bien encore celle du papier et du cuir pour le traitement des effluents.

La nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (OI) sont utilisées lorsque des solutés de faibles poids moléculaires tels que des sels minéraux ou de petites molécules organiques ( $\leq 200$  Da) doivent être séparés du solvant. Les deux procédés reposent sur les mêmes principes de séparation basés sur des différences de solubilité et de diffusion. Les membranes asymétriques utilisées ont un diamètre de pores plus petit qu'en UF ( $< 2$  nm), avec une densité et une résistance hydrodynamique plus élevée, nécessitant l'application de pressions plus fortes pour permettre le passage à travers la membrane de la même quantité de soluté. De plus, pour que le solvant diffuse du rétentat concentré vers le perméat dilué, la pression appliquée doit être supérieure à la pression osmotique. Les applications de l'OI sont variées et peuvent être classées en deux catégories : la purification de solvants où le produit d'intérêt est le perméat et la concentration de solutés où l'on recueille le rétentat. Elle est couramment utilisée pour le dessalement d'eau usée ou d'eau de mer, la production d'eau ultra-pure, la concentration de jus de fruits, de sucres ou de lait. Dans le cas du traitement de l'eau de mer la pression doit être très élevée : 40 à 80 bars contre 15 à 25 pour les autres applications.

La nanofiltration (NF) est un procédé de séparation membranaire relativement récent dont le pouvoir de séparation se situe entre celui de l'ultrafiltration et de l'osmose inverse. Son nom fait référence à la taille des pores des membranes dont le diamètre est inférieur à 2 nanomètres ce qui correspond à des seuils de coupures compris entre 200 et 1000 Da (Eriksson, 1988). La distribution étroite des pores des membranes de nanofiltration leur confère une structure plus lâche que les membranes d'OI, permettant d'obtenir des flux de perméation supérieurs tout en travaillant à des pressions plus basses (Levenstein et al., 1996). Du fait de cette structure plus lâche, la rétention des ions monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ...) est inférieure à celle de l'osmose inverse mais la rétention des ions bivalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ...) est encore très élevée. Autre particularité en NF, les matériaux membranaires utilisés possèdent pour la plupart des groupements ionisables et sont généralement chargés négativement. Il est ainsi possible de séparer sélectivement des ions monovalents (Rétention quasi-nulle,  $\sigma \approx 0$ ) et des ions multivalents (Rétention quasi-totale,  $\sigma \approx 1$ ) et plus généralement des molécules de même taille selon qu'elles présentent ou non une charge électrique (Rautenbach et Gröschl, 1990).

Les membranes de nanofiltration peuvent être organiques ou inorganiques. Dans les deux cas elles sont constituées d'une structure asymétrique à trois niveaux (Garem, 1995). Tout d'abord un support macroporeux assure une bonne résistance mécanique et des flux de perméation élevés. Ce support est ensuite relié par l'intermédiaire d'une couche mésoporeuse à la couche active microporeuse de faible épaisseur (moins d'un micron). Les membranes inorganiques à bases de céramique ou de carbone et d'oxydes métalliques possèdent des pores constitués d'espaces intergranulaires de dimensions uniformes. Le cas des membranes organiques est un peu plus complexe : constituées de polymères, les pores résultent d'espaces interchaînes. De plus, en fonction de la pression appliquée et de la nature physico-chimique du fluide traité, le polymère est susceptible de gonfler faisant ainsi varier la taille de pores (Garem, 1995). Déjà largement exploitée dans le traitement des eaux usées ou la déminéralisation du lactosérum, la NF trouve de plus en plus d'applications dans le traitement des effluents. Actuellement, l'élaboration constante de nouveaux matériaux membranaires spécifiques permet une continuelle progression du procédé de nanofiltration et surtout l'élargissement de ses champs d'application (tableau 2).

**TABLEAU 2 : Exemples d'applications de la nanofiltration**

<b>Applications</b>	<b>Auteurs</b>
<b>Déminéralisation</b>	
Lactosérum	Barrantes et Morr (1997); van der Horst et al. (1995); Kelly et Kelly (1995); Jelen (1991)
Lait	Eckner et Zottola (1992a,b)
<b>Recyclage d'effluents</b>	
Mines de charbon	Turek et Gonet (1996)
Industries sucrières	Wadley et al. (1995)
Fromageries	Sanderson et al. (1994), Jensen (1996)
Textiles	Chen et al. (1997)
Eaux usées	Rautenbach et Linn (1996); Rautenbach et al. (1996)
<b>Production d'eau potable</b>	Ericsson et al. (1996); De Witte (1996)
<b>Production d'acide acétique</b>	Han et Cheryan (1996)
<b>Production d'acide lactique</b>	Timmer et al. (1993)

## 4.2. Principes de séparation en nanofiltration

En nanofiltration, les mécanismes de séparation solvant / soluté sont généralement décrits en terme d'interactions ioniques et/ou stériques (Chaufer et al., 1996). Dans le cas des molécules non chargées, le transport s'effectue sous l'effet de la différence de pression (convection) et du gradient de concentration (diffusion) existant de part et d'autre de la membrane. Leur rétention est due uniquement à des mécanismes d'exclusion stérique : selon le modèle développé par Ferry (1936) seules les molécules de rayon  $r_s$ , inférieur au rayon des pores de la membrane  $r_p$ , sont susceptibles d'être transférées dans le perméat. La rétention stérique  $R_s$  du soluté est exprimée en fonction du rapport  $\lambda = r_s/r_p$  tel que :

$$R_s = (1 - (1 - \lambda)^2)^2 \quad [1]$$

Pour les molécules chargées, les mécanismes sont plus complexes car des interactions électrostatiques prennent place non seulement avec la membrane mais aussi entre molécules. L'effet de la charge de la membrane sur le transport des composés chargés a été décrit par Donnan au début du siècle (Donnan, 1911).

Lorsqu'une membrane chargée est placée dans une solution d'électrolytes, un équilibre se crée entre la membrane et la solution. De part la présence de charges fixes (généralement négatives en NF) sur la membrane, les concentrations ioniques à la membrane et dans la solution ne sont pas égales. Les contre-ions (de charge opposée à celle de la membrane) sont fortement attirés dans la membrane pour écranter les charges fixes qui s'y trouvent, tandis que les co-ions (de même signe que la membrane) sont repoussés dans la solution. Il s'établit par conséquent une distribution différentielle de part et d'autre de la membrane : les co-ions se retrouvent en plus faible concentration à la membrane que dans la solution et inversement pour les contre-ions. Lorsqu'on applique une pression et que l'on passe en mode dynamique, une différence de potentiel appelée potentiel de Donnan apparaît alors à l'interface pour tenter de créer un nouvel état d'équilibre thermodynamique. Le flux convectif excédentaire des contre-ions ( $Jc^+ \gg Jc^-$  sur la figure 3) perturbe l'électroneutralité

du système, et génère un champ électrique (E) qui s'oppose à ce flux et tend à équilibrer à l'état stationnaire le transport des co-ions et des contre-ions. Cet équilibre est fonction de la charge de la membrane, du co-ion, du contre-ion, ainsi que de la concentration du soluté, c'est-à-dire de la force ionique. Le flux du soluté  $J_s$  résulte lui des flux convectifs ( $J_c$ ) et électro-migratifs ( $J_e$ ) du co-ion et du contre ion ( $J_s = J_c^+ - J_e^+ = J_c^- + J_e^-$ ).

Le principe de Donnan et ses implications sont cependant très complexes et difficilement extrapolable à des solutions mixtes. En effet les phénomènes de couplage, de compétition ainsi que les différences de mobilité entre les composés ioniques compliquent infiniment l'interprétation des résultats. Par exemple, en accord avec la théorie de Donnan, si l'on mélange deux co-ions, un monovalent et un multivalent, le monovalent sera moins repoussé par la membrane et par conséquent moins retenu que le multivalent. De même, un co-ion mis en présence d'un contre-ion multichargé aura une rétention inférieure à celle du même co-ion mélangé à un contre-ion possédant une charge unique. Ceci est dû à la plus grande facilité pour le contre-ion multivalent d'aller s'accrocher à la membrane et de neutraliser ainsi ses charges (Chaufer et al., 1996).

### **4.3. État des connaissances sur le fractionnement d'hydrolysats protéiques par UF et NF**

#### **4.3.1. Travaux portant sur l'UF**

La première tentative de fractionnement d'un hydrolysats protéique par un procédé à membrane a été réalisée par Brulé et al. en 1980. L'étude consistait à mettre au point un procédé de préparation de peptides de phosphocaséinates à partir d'un hydrolysats de caséines ultrafiltré. L'ajout dans le milieu réactionnel de calcium se couplant aux phosphosérines provoquait la formation d'aggrégats trop gros pour traverser la membrane, et permettait ainsi de les concentrer dans le rétentat. Par la suite Walsh et al. (1989) ont

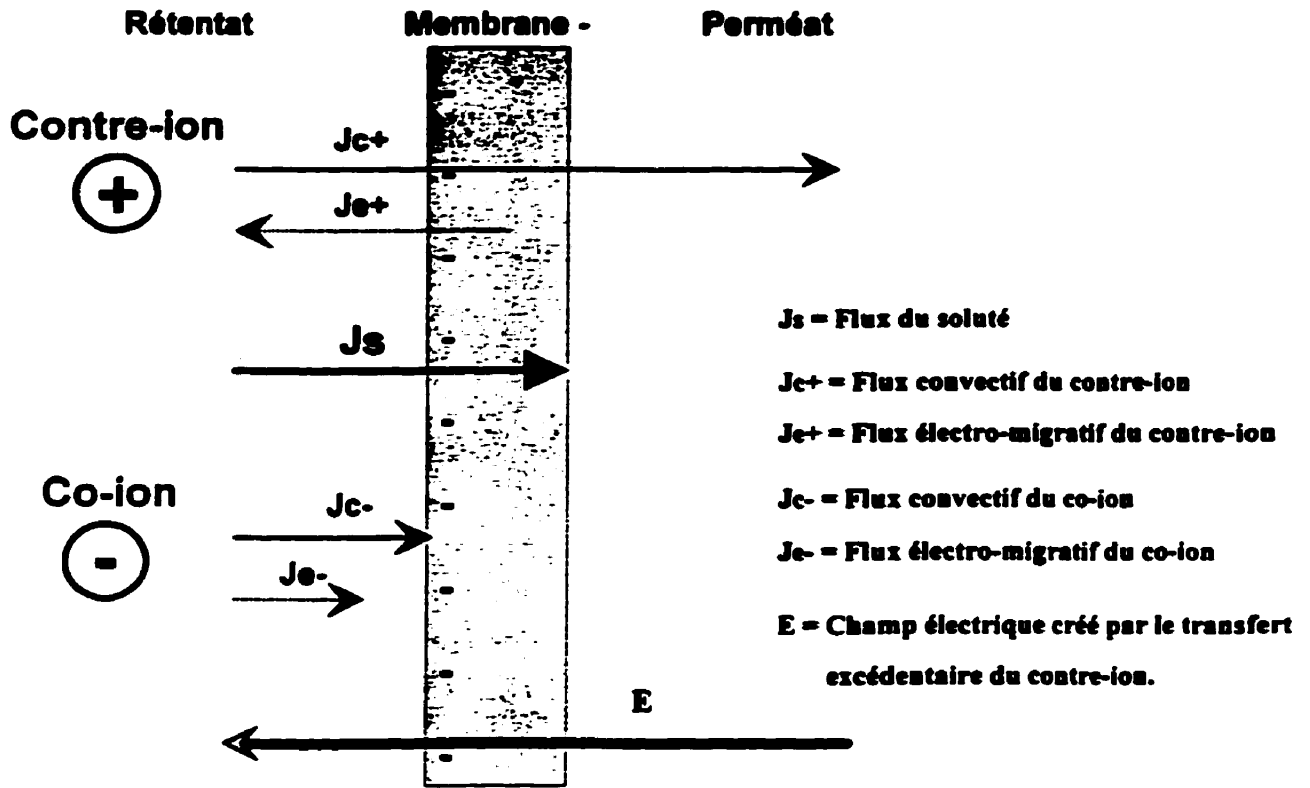


FIGURE 3 :

**Représentation schématique des flux convectifs ( $J_c$ ) et électro-migratifs ( $J_e$ ) du co-ion et du contre-ion (Garem, 1995)**



étudié les propriétés de rejet des membranes d'UF métalliques avec des acides aminés, du calcium et des hydrolysats de caséines. Ils ont pu mettre en évidence l'importance du pH et des charges de la membrane dans les mécanismes de passage des particules chargées telles que les acides aminés ou le calcium. Ces résultats ont été confirmés par Nau et al. (1995). À partir du fractionnement d'hydrolysats tryptiques de  $\beta$ -caséines, ils ont montré que les mécanismes de transmission des peptides ne reposaient pas uniquement sur le concepte d'exclusion stérique mais dépendaient aussi et surtout des interactions ioniques peptides-membrane et peptides-peptides. Ils ont de ce fait mis en lumière le rôle prédominant du pH, de la force ionique et du potentiel électrique des matériaux (membrane et peptides).

Parallèlement, Turgeon et Gauthier (1990) ont fractionné un hydrolysate tryptique de protéines du lactosérum en utilisant un procédé combiné d'hydrolyse enzymatique et d'ultrafiltration. En intégrant ainsi une unité d'ultrafiltration (UF) à un bioréacteur, on peut simultanément stopper la réaction enzymatique en séparant l'enzyme de son substrat et obtenir des fractions protéiques spécifiques. Ce principe offre aussi l'avantage de supprimer l'étape d'inactivation thermique de l'enzyme qui est très dénaturante et occasionne la formation d'agrégats. Des phénomènes d'encrassement sévères peuvent toutefois survenir, comme dans le cas du fractionnement d'hydrolysats de caséines : les interactions peptides/membrane peuvent en effet affecter à la fois le flux de perméation et les propriétés de rejet de la membrane. L'adsorption de ces peptides à la surface de la membrane dépend principalement de leur taille, de leur charge, de leur hydrophobicité, et dans une moindre mesure des conditions physico-chimiques (pH, concentration en sodium soluble) du milieu (Pouliot et al., 1993; Gourley et al., 1995; Gourley et al., 1998). Dans le cadre de leur étude, Turgeon et Gauthier (1990) ont appliqué deux UF successives avec un seuil de coupure 30 KDa puis de 1 KDa. Elles ont obtenus deux fractions, l'une constituée de courts peptides et d'acides aminés, l'autre d'un mélange de polypeptides. Il s'est avéré que ce mélange polypeptidique démontrait des propriétés interfaciales supérieures à celles des protéines du lactosérum (Turgeon et al., 1991). Cependant, bien qu'il ait été plus efficace à abaisser la tension de surface, ce mélange démontrait des propriétés émulsifiantes inférieures de 20% à celle des protéines natives. Ajouté à la formulation

d'une vinaigrette, il a néanmoins permis d'obtenir des émulsions stables possédant une structure proche de celle d'une mayonnaise (Gauthier et al., 1993).

Il ressort de l'ensemble de ces travaux que la sélectivité des membranes d'UF ne dépend pas uniquement du seuil de coupure (mécanisme d'exclusion stérique) mais aussi de la nature du matériau membranaire, de la charge des peptides ainsi que du pH et de la force ionique de la solution. Pour amplifier ces effets de charge et augmenter le pouvoir résolutif du procédé d'UF, Daufin et al. ont couplé en 1995 des membranes d'UF à un champ électrique. Ce procédé s'est avéré efficace pour fractionner des solutions d'acides aminés et de peptides. Cependant, l'électro-ultrafiltration en est encore pour l'instant au stade expérimental. Dans le même but d'intensifier la séparation sélective, Kimura et Tamano (1986) ont élaboré des membranes d'ultrafiltration chargées négativement par dépôt de polysulfone sulfonée sur des membranes minérales tubulaires. En les utilisant avec un mélange d'acides aminés, ils ont obtenu à pH 6 des écarts de transmission supérieurs à 80 % entre l'acide aspartique (négatif à ce pH) et l'isoleucine (zwitterion). Mais c'est avec l'avènement de la nanofiltration que l'on a enfin disposé d'un procédé hautement résolutif permettant de séparer des molécules selon de faibles différences de charge, de taille et d'hydrophobicité.

#### **4.3.2. Travaux portant sur la NF**

Face à la complexité des mécanismes impliqués dans le transfert de molécules chargées en NF, les auteurs ont la plupart du temps recours à l'utilisation de solutions modèles simples parfaitement caractérisées. Tsuru et al. (1994), par exemple, ont utilisé des mélanges connus d'acides aminés et de di- ou de tripeptides pour comparer les performances de six membranes commerciales de nanofiltration. Il est apparu que les membranes possédant un seuil de coupure inférieur à 300 Da n'étaient pas appropriées pour séparer efficacement des mélanges de peptides et d'acides aminés. Par contre, lorsque les seuils de coupure étaient compris entre 2000 et 3000 Da, ils pouvaient observer une séparation sélective basée sur la

charge. Les molécules chargées étaient rejetées alors que les neutres traversaient la membrane. La forte rétention des molécules chargées a pu être interprétée en se basant sur les principes énoncés par Donnan (1911). De plus, ils ont montré que l'intensité de la sélectivité de séparation entre acides aminés ou peptides neutres et chargés augmentait avec l'écart entre le pH de la solution et le pI. Cependant cette étude utilisait des solutions extrêmement simples ne contenant pas plus de une ou deux espèces (chargée ou neutre).

Afin de se rapprocher de la complexité réelle d'un hydrolysat protéique, Garem et al. (1996) ont testé la sélectivité de deux membranes organiques (500 et de 1000 Da) sur une solution parfaitement caractérisée de 15 acides aminés. Ils se sont appliqués à caractériser les transmissions obtenues sous l'effet d'une variation de pH, de concentration en sels inorganiques et de pression membranaire. Avec la membrane de faible seuil de coupure, la séparation des acides aminés était basée sur une forte exclusion stérique. Avec la membrane de 1000 Da, les résultats, compatibles avec les principes de la théorie de Donnan, ont montré que la transmission dépendait principalement du pH et dans une moindre mesure de la force ionique et de la pression membranaire. Néanmoins, la densité de charge membranaire était faible et l'écart maximum entre les transmissions des acides aminés n'excédait pas les 30%. Afin de mettre ces effets de charges en exergue, cette même équipe (Garem et al., 1997) a alors eu recours à un prototype de membrane organique-inorganique (M5+PEI, Tech Sep). Cette membrane chargée de NF démontre un fort comportement amphotérique avec le pH. Utilisée avec une solution équimolaire de neuf acides aminés (AA), elle a permis de mettre en évidence deux maxima de sélectivité en fonction du pH : un à pH inférieur à 3 où les AA acides sont séparés et un second supérieur à 9 où les AA basiques sont séparés. Afin de se rapprocher encore plus des conditions d'un hydrolysat, Garem et al. (1998) ont utilisé cette même membrane, ainsi qu'une deuxième entièrement inorganique, sur un mélange de 10 petits peptides connus, issus d'un hydrolysat tryptique de caséine  $\beta$ . La force ionique et le pH se sont avérés encore une fois cruciaux. À pH 8, (pH optimum pour une bonne séparation), la transmission des peptides basiques était très élevée voir même supérieure à 100%, intermédiaire pour les neutres, et faible pour les acides. L'addition d'un co-ion multichargé augmentait la sélectivité alors que celle d'un contre-ion de la membrane l'inversait.

Tous ces résultats ont été repris par Martin-Orue et al. (1998) qui ont tenté de dégager un mécanisme général de séparation des acides aminés et des peptides par nanofiltration. La membrane utilisée était inorganique et les solutions modèles avaient une complexité croissante : la plus simple contenait un acide aminé et son contre-ion inorganique (GluNa ou LysCl) et la plus complexe un mélange de 4 peptides. Contrairement aux études précédentes, les auteurs ont mis en lumière le fait qu'on ne pouvait pas prendre en compte uniquement la charge nette d'un acide aminé ou plus encore d'un peptide et que se limiter à considérer ces solutés multichargés comme des espèces neutres, co-ions ou contre-ions de la membrane serait trop réducteur. La distribution des résidus chargés dans leur séquence jouent aussi un rôle dans les interactions peptides/membrane. Les autres conclusions confirment par contre les études précédentes. La charge est le critère prédominant dans la séparation des espèces possédant un poids moléculaire voisin. Le pH est le paramètre le plus important car il détermine à la fois l'état d'ionisation des solutés et la densité de charges de la membrane. La force ionique peut diminuer l'intensité des effets de charges. Chaque acide aminé ou peptide chargé interagit avec les groupements ionisés de la membrane. Ces interactions induisent une répulsion des co-ions d'où un flux transmembranaire des contre-ions en excès par rapport à celui de ces co-ions. Il en résulte l'apparition d'un champ électrique de part et d'autre de la membrane. Un flux électromigratif des contre-ions se crée alors dans le sens opposé afin de maintenir l'électroneutralité de part et d'autre de la membrane (principe de Donnan). Lorsque plusieurs contre-ions sont présents à la même concentration dans la solution, leur contribution à l'équilibre de Donnan dépend de leur mobilité électrophorétique respective. Si ces contre-ions possèdent plusieurs charges, ils peuvent aussi neutraliser les groupements chargés de la membrane réduisant ainsi sa densité de charge.

Tous ces travaux portant sur des systèmes modèles montrent que la NF peut être utilisée pour fractionner des mélanges de peptides tels que les hydrolysats. Wijers et al. (1998) ont étudié les performances de 6 membranes de nanofiltration fortement chargées négativement pour le dessalage d'un hydrolysat tryptique de protéines de lactosérum contenant 0.5 mol/L de NaCl. Toutes les membranes se sont avérées efficaces aussi bien en mode frontal que tangentiel. La MX07 (en polyamide laminé sur un support de polysulfone de chez

Osmonics) s'est cependant démarquée des autres par un dessalage maximal allié à une perte minimale du matériel peptidique. Seulement 6 peptides possédant une charge nette de 0 ou +1 ont été retrouvés dans le perméat en faible quantité (< 11 %), tandis que la rétention des peptides de même taille comprenant des résidus acides dans leur séquence étaient de 100 %. La même équipe (Pouliot et al., 1999) a par la suite réalisé la première étude portant sur la séparation par NF de peptides d'un hydrolysate. L'hydrolysate avait été préparé à partir d'un isolat de protéines du lactosérum traité à la trypsine puis ultrafiltré sur une membrane de 10 KDa afin de stopper la réaction. Parmi les 5 membranes de NF testées, la SG13 (Osmonics), possédant un seuil de coupure situé entre 1000 et 5000 Da, a fait preuve des meilleures propriétés de séparation combinées aux plus hauts flux. Elle a par conséquent été retenue pour les études de l'effet du pH (entre 5 et 9) et de la force ionique (0 ou 0.5 M de NaCl). Ils ont ainsi pu constater qu'une élévation de pH augmentait le flux et la transmission d'azote, tout en diminuant l'encrassement. L'addition de NaCl par contre, augmentait la perméabilité mais aussi l'encrassement. L'effet de charge ainsi que les principes de Donnan étaient illustrés par le fait que les peptides neutres et positifs traversaient la membrane alors que ceux chargés négativement étaient retenus. La meilleure séparation entre peptides acides et basiques était observée à pH 9, à faible force ionique, sans addition de sels. Ces conclusions montrent l'intérêt de nouvelles investigations dans la zone alcaline de pH afin de déterminer les conditions optimales d'une séparation des peptides.

## **BUT ET OBJECTIFS**

Le but de ce projet était **d'améliorer notre compréhension des mécanismes de fractionnement de mélanges peptidiques par nanofiltration et ce, en vue d'évaluer le potentiel de la NF pour la préparation de grandes quantités de fractions peptidiques à haute fonctionnalité.** Pour atteindre ce but, nous nous sommes fixés deux objectifs :

**OBJECTIF 1 :                   ÉTUDIER L'IMPACT DE LA COMPOSITION DE LA MATIÈRE PREMIÈRE (DEGRÉ DE PURETÉ DE LA  $\beta$ -LACTOGLOBULINE) SUR CELLES DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES OBTENUS**

**OBJECTIF 2 :                   ÉTUDIER L'IMPACT DES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES (pH) SUR LES CARACTÉRISTIQUES DE SÉPARATION PAR NF D'UN HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE  $\beta$ -LACTOGLOBULINE**

Afin de réaliser ces objectifs, deux hydrolysats ont été mis au point : le premier à partir de  $\beta$ -lg commerciale obtenu par chromatographie (Davisco Foods International Inc.) et le deuxième à partir d'une  $\beta$ -lg purifiée au laboratoire selon la procédure de Léonil et al. (1997).

Les résultats obtenus suite à la réalisation des objectifs 1 et 2 sont présentés dans les chapitres 2 et 3 du mémoire. Ces chapitres sont rédigés sous forme d'articles scientifiques et ce dans l'objectif d'éventuelles publications. Chaque chapitre est composé d'une introduction, des sections matériel et méthodes, résultats et discussion, et enfin conclusion et bibliographie. Le mémoire se termine par une conclusion générale qui expose les grandes lignes de ce travail, soulève les points importants et permet d'envisager certaines avenues de travaux futurs. Finalement, la bibliographie générale présentée à la toute fin du mémoire regroupe les ouvrages cités dans l'introduction générale et la revue de littérature.

## **CHAPITRE 2**

### **IMPACT DE LA COMPOSITION DE LA MATIÈRE PREMIÈRE SUR CELLES DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES OBTENUS**



## 1. INTRODUCTION

L'hydrolyse enzymatique est une technique utilisée depuis plusieurs années dans le but de modifier les propriétés fonctionnelles, nutritionnelles et biologiques des protéines. Elle permet, tout en augmentant la digestibilité et la solubilité des protéines, de diminuer leur allergénicité ainsi que leur viscosité, et de modifier significativement leurs propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes (Reddy et al., 1988). Plusieurs peptides possédant des caractéristiques intéressantes ont pu ainsi être identifiés. Dans certains cas, ils ont conduit à des applications industrielles dans des secteurs tels que la pharmacologie, la cosmétologie, et l'alimentation. A ce titre, les caséines du lait et protéines du lactosérum présentent un grand intérêt car elles sont un réservoir important de ces peptides particuliers.

La  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) est la plus abondante (60%) des protéines du lactosérum, et l'on considère que son comportement fonctionnel traduit celui de l'ensemble du système lactosérique (Eigel et al., 1984; Fox, 1982). Parmi les protéines du lait, elle est la plus résistante à la protéolyse, et cette résistance serait due à sa conformation globulaire compacte (Dalgarrondo, et al., 1990). Elle est toutefois sensible à l'hydrolyse par la trypsine, une endoprotéase pancréatique d'une spécificité très stricte dont les sites de coupure se limitent à deux acides aminés : la lysine et l'arginine. Plusieurs auteurs ont étudié les peptides issus de cette hydrolyse. Turgeon et al. (1992) ont montré que les segments 21-40 et 41-60 caractérisés par un poids moléculaire et une hydrophobicité élevés, étaient responsables de l'amélioration des propriétés interfaciales de la  $\beta$ -lg suite à son hydrolyse. Différents peptides bioactifs ont également été identifiés tel que le fragment 102-105 à activité opioïde, appelé  $\beta$ -lactorphine (Chiba et Yoshikawa, 1986), ou la  $\beta$ -lactotensine, fragment 146-149, capable de provoquer des contractions musculaires (Yamauchi, 1992).

En vue d'obtenir de nouveaux peptides hautement fonctionnels et/ou bioactifs, il est essentiel de contrôler le degré d'hydrolyse (DH) des protéines. Il existe en effet un degré d'hydrolyse optimal, spécifique à la nature de la protéine, à l'enzyme utilisée et à la

propriété étudiée (Kinsella et al., 1989). De plus, l'efficacité de l'hydrolyse dépend de la composition et de l'état physico-chimique du substrat. Afin d'étudier ces facteurs, Pouliot et al. (1995) ont remplacé le caséinate de sodium généralement utilisé pour produire des hydrolysats de caséines, par du lait écrémé en poudre haute et basse température. Globalement, ils ont montré que les modifications au niveau du profil des acides aminés et des peptides étaient mineures. Les différences se situaient plutôt au niveau de la teneur en lactose et en sels qui était plus élevée dans les hydrolysats faits à partir de lait écrémé en poudre que dans ceux de caséinate de sodium. Ces différences pouvant être corrigées par des procédés de diafiltration, ils ont estimé que le lait en poudre pouvait convenir comme substrat pour produire des hydrolysats de caséines. Dans le commerce, la  $\beta$ -lactoglobuline est disponible sous forme plus ou moins purifiée selon qu'elle est préparée par des procédés d'adsorption sur des résines d'échanges ioniques ou par des méthodes chromatographiques. Mais il est aussi possible de réaliser cette purification sous traitement thermique modéré à bas pH dans des conditions réactionnelles très peu dénaturantes, et tel que proposé par Léonil et al. (1997).

Notre objectif est donc d'étudier l'impact de la composition de deux sources de  $\beta$ -lg sur celles des hydrolysats tryptiques obtenus. Pour ce faire nous avons utilisé une  $\beta$ -lg commerciale obtenue par chromatographie ainsi qu'une  $\beta$ -lg expérimentale que nous avons purifiée au laboratoire selon le procédé de Léonil et al. (1997). Des analyses ont été réalisées afin de déterminer la composition de ces produits avant et après hydrolyse. Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus pour un hydrolysat tryptique préparé à partir d'un isolat commercial de protéines de lactosérum (*Bipro*, Davisco), et dont les données de composition étaient disponibles dans la littérature (Pouliot et al., 1999).

## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1. Préparation de la $\beta$ -lg expérimentale**

Un volume de 800 L de lait écrémé (CRDA, St-Hyacinthe, Qc) a été microfiltré sur une unité Pilot Plan type MFS-7 Alfa-Laval, équipée d'une membrane SCT Membralox de céramique d'une porosité de 0.1  $\mu\text{m}$  et de 1.4  $\text{m}^2$  de surface. La pression transmembranaire était maintenue entre 0.5 et 0.8 bars, à une température moyenne de 23 °C (+/- 2 °C), et avec une vitesse de recirculation de 6 mètres par seconde. Le suivi se faisait par mesure de conductivité. La réaction a été stoppée au bout de 7 h après avoir atteint un facteur de concentration volumique (FCV) de 2.

Les 400 kg de perméat de microfiltration obtenus ont ensuite été ultrafiltrés sur une membrane spiralée de polysulfone possédant un seuil de coupure de 5 KDa (Koch Membrane Systems Inc., Wilmington, MA, USA). La température était maintenue à 23 °C (+/- 2 °C) et la pression transmembranaire à 2.5 bars. La réaction a été stoppée au bout de 75 min à un FCV de 6 et le rétentat congelé pour être utilisé dans les expériences ultérieures de précipitation.

En se basant sur le protocole de Léonil et al. (1997), et selon les modifications aimablement communiquées par Fauquant et Henry (INRA, Rennes, France), le pH du perméat d'UF a été abaissé à 3.8 à l'aide d'acide citrique 2 M. Le mélange a alors immédiatement été chauffé à 56 °C en bain thermostaté durant 30 min sans agitation afin de déclencher la polymérisation thermique de l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -la). Les co-précipités d' $\alpha$ -la, de sérum albumine bovine (BSA) et d'immunoglobulines (Igs) ont ensuite été séparés par centrifugation (2900 rpm rotor GSA Sorvall Du Pont Instruments, 100 min, 28 °C) et le surnageant placé à 4 °C. Au bout de 48 h, une nouvelle centrifugation a été effectuée (2900 rpm, 100 min, 15 °C). Lorsque le culot était trop important, une troisième centrifugation était appliquée dans les mêmes conditions. Les culots contenant l' $\alpha$ -la, la BSA et les Igs

étaient systématiquement écartés alors que les surnageants riches en  $\beta$ -lg étaient recueillis puis lyophilisés pour usage ultérieur. Nous avons ainsi pu produire 4.3 kg de poudre de  $\beta$ -lg expérimentale ( $\beta$ -lgE).

## **2.2. Hydrolyse trypsique de la $\beta$ -lg expérimentale et commerciale**

Pour la préparation des hydrolysats totaux (HT), deux sources différentes de  $\beta$ -lg ont été utilisées : la  $\beta$ -lgE préparée selon la méthode de Léonil et al. (1997) adaptée à nos essais et une  $\beta$ -lg commerciale ( $\beta$ -lgC) provenant de chez Davisco (Davisco Foods International Inc., Le Sueur, MN, USA ; lot JE 002-8-922).

L'hydrolyse de la  $\beta$ -lgE s'est déroulée en deux étapes. Une première solution protéique a été préparée en réhydratant une partie de la poudre de  $\beta$ -lgE dans d'eau distillée (13 % de solides totaux, pH 3.63). Le mélange a ensuite été diafiltré 3X puis concentré 2X en mode batch à l'aide d'un système d'ultrafiltration (Amicon DC 10 I, Danvers, MA, USA) composé d'un réservoir de 20 L et d'une cartouche de fibres creuses (PM 10, Romicon Inc., Woburn, MA, USA). Cette étape était menée à des fins de dessalage. Le seuil de coupure des membranes de polysulfone s'élevait à 10000 Da avec une surface effective de 0.7 m<sup>2</sup>. La pression transmembranaire appliquée était de  $2.5 \times 10^5$  N.m<sup>-2</sup> à température pièce. Le rétentat recueilli (6.6 L) a immédiatement été transféré dans un bioréacteur (Biogénie Inc., Québec, Qc, Ca). La température a été stabilisée à 40°C sous agitation (200 rpm) et du CaCl<sub>2</sub> a été ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 0,01 M. Le pH a alors été ajusté à 8 à l'aide d'hydroxyde de sodium 2 N. La réaction d'hydrolyse a été initiée par ajout d'une solution de trypsine VI (Inovatech Inc., Abbotsford, BC, Ca) dissoute à 12 % (p/v) dans de l'acide chlorhydrique 0.001 N. Le ratio final enzyme : substrat était de 1 : 79.7. La réaction a été menée en mode pH-stat (Adler-Nissen, 1986) en maintenant le pH à 8 par ajout de NaOH 4 N. L'hydrolyse a été arrêtée au bout de 115 min à un DH de 11.3 % en effectuant une ultrafiltration du mélange réactionnel dans les mêmes conditions que la diafiltration précédente. En se basant sur le même protocole, une

deuxième solution protéique a été préparée en réhydratant la poudre de  $\beta$ -IgE restant (12 % de solides totaux, pH 3.71) pour ensuite être diafiltrée 3 X et concentrée 2X. Les mêmes conditions d'hydrolyse ont été appliquées avec cette fois un ratio enzyme : substrat de 1 : 100. La réaction a été stoppée par UF au bout 90 min (DH 10.3 %). Les deux hydrolysats ont été lyophilisés puis mélangés donnant un DH final de 10.8 %. L'hydrolysats total de  $\beta$ -IgE résultant (HTE) a été stocké à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Le deuxième hydrolysats a été préparé à partir de la poudre de  $\beta$ -IgC. Un volume de 2.5 L d'une solution à 10 % de protéines (pH 6.68) a été introduit dans le bioréacteur. La température a été ajustée à  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  sous agitation (200 rpm) et du  $\text{CaCl}_2$  a été ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 0,01 M. Le pH a été ajusté à 8 à l'aide d'hydroxyde de sodium 2 N. La réaction d'hydrolyse a été initiée par ajout d'une solution de trypsine VI (Innovatech) dissoute à 12 % (p/v) dans de l'acide chlorhydrique 0.001 N. Le ratio final enzyme : substrat était de 1 : 100. La réaction était contrôlée par pH stat (pH 8, NaOH 2 N) et stoppée par UF à un DH de 10.8 % au bout de 50 min. Le perméat a alors été lyophilisé et stocké à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . L'hydrolysats total était nommé HTC.

### **2.3. Méthodes analytiques**

La teneur totale en azote des échantillons a été déterminée en duplicata sur base humide et triplicata sur base sèche par la méthode Kjeldahl (IDF; 1986) à l'aide d'un appareil Büchi 430 équipé d'une unité de distillation 321 (Brinkman Instruments, Montréal, Qc, Ca).

La teneur en lactose a été établie par spectrophotométrie en triplicata à l'aide d'une méthode enzymatique (Boehringer Mannheim, 1989). Les solides totaux et les cendres ont été déterminés par pesées après séchage dans un four à vide à  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  puis calcination à  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 8 h dans des creusets conditionnés (méthode AOAC, 1980).

Le dosage des cations et des anions a été réalisé à l'aide d'un appareil d'électrophorèse capillaire (model <sup>3D</sup>CE, Hewlett Packard, Kirkland, Qc, Ca) muni d'un capillaire de silice possédant un diamètre de 50 µm et une longueur de 25 cm. Pour les anions, un tampon d'acide pyromellitique, d'hydroxide de sodium, d'hydroxide d'hexamethonium et de triéthanolamine a été utilisé (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Pour les cations, le tampon contenait du sulfate cuivrique, du 18-crown, et de l'acide formique. L'injection des échantillons durait 4 sec. à 50 mbar et la détection se faisait à 350 nm pour les anions et 340 nm pour les cations. Les standards utilisés (NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, CaCO<sub>3</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>) provenaient tous de Fluka biochemica (Buchs, Allemagne).

Les analyses de chromatographie liquide haute-performance en phase inverse (RP-HPLC) ont été réalisées en C<sub>18</sub> au moyen d'une colonne Nova-Pak (3.9 i.d. X 150 mm, Waters, Milford, MA, USA). Les conditions étaient les suivantes : débit 1 mL.min<sup>-1</sup>; température de la colonne 40 °C; solvant A, 0.11 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) dans de l'eau; solvant B, 60 % (v/v) d'acétonitrile 40 % (v/v) d'eau et 0.1 % (v/v) de TFA. L'élution des échantillons se faisait selon un gradient linéaire de 0 à 60 % de B en 30 min. L'absorbance était mesurée à 220 nm. L'identification des protéines majeures étaient réalisées par RP-HPLC sur une colonne C<sub>4</sub> Vydac 214TP54 (4.6 i.d. X 250 mm, Hesperia, CA, USA) selon les conditions suivantes : débit 1 mL.min<sup>-1</sup>; température de la colonne 39 °C, solvant A, 10 % (v/v) d'acétonitrile, 0.11 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) dans de l'eau; solvant B, 90 % (v/v) d'acétonitrile, 10 % (v/v) d'eau et 0.1 % (v/v) de TFA. L'élution était obtenue avec un gradient de 15-37 % de B pendant 15 min., 37-45 % de B pendant 18 min., 45-70% de B pendant 2 min., 70 % de B pendant 5 min. et 70-15 % de B pendant 2 min. Les standards utilisés (la BSA, l'α-la, la β-IgA et B) provenaient de Sigma (Saint-Louis, MO, USA).

Les analyses de chromatographie en exclusion moléculaire (HPSEC) ont été réalisées sur une colonne BioSEP-SEC S2 000 (7.8 i.d. X 300 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) connectée en serie à une pré-colonne (7.8 i.d. X 75 mm). Un tampon de phosphate de sodium 0.1 mol.L<sup>-1</sup> à pH 6.8 a été utilisé pour réaliser une élution isocratique à un débit de 1.0 mL.min<sup>-1</sup>. La détection se faisait à 220 nm. Les standards utilisés étaient les suivants :

chymotrypsinogène A 25 Kda, BSA 67 Kda, ovalbumine 43 Kda, ribonucléase A (Pharmacia, Baie d'Urfée, QC, CA);  $\beta$ -lg et  $\alpha$ -la (Sigma, Saint-Louis, MO, USA); fractions peptidiques 15-20, 142-148 et 41-60 de la  $\beta$ lg, 23-34 de la caséine  $\alpha$ -s<sub>1</sub> et 193-202 de la caséine  $\beta$  (service de séquence de peptides de l'est du Québec, Sainte-Foy, Qc, CA).

### **3. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

#### **3.1. Caractérisation des substrats et des hydrolysats totaux**

Le tableau 1 présente la composition en protéines de la  $\beta$ -lgE et de la  $\beta$ -lgC déterminée par RP-HPLC. Dans le cas de la  $\beta$ -lgE, la teneur en protéines totale est de 66.7 % (p/p) avec une forte proportion de  $\beta$ -lg (95.3 %). A l'inverse, la teneur en protéines totale de la  $\beta$ -lgC est très élevée (98.2 %, p/p) avec une proportion de  $\beta$ -lg n'excédant pas 83.9 %. Concernant l' $\alpha$ -la, sa teneur est 7 fois plus élevée dans la  $\beta$ -lgC (12.7 %) que dans la  $\beta$ -lgE (1.8 %). Le procédé de Léonil et al. (1997) permet donc d'obtenir, après diafiltration, une teneur en  $\beta$ -lg plus élevée que la chromatographie, mais avec par contre une teneur en protéine totale beaucoup plus faible.

Le tableau 2 présente la composition détaillée des deux hydrolysats totaux obtenus par hydrolyse trypsique de la  $\beta$ -lgE et C: le HTE et le HTC. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus par Pouliot et al. (1999) par hydrolyse trypsique d'un isolat de protéines de lactosérum commerciale : le Bipro. Lors de l'hydrolyse, les seuls composés ajoutés au substrat était l'enzyme, le NaOH et le CaCl<sub>2</sub>. Les protéines non hydrolysées et l'enzyme ont été éliminées par UF une fois le DH visé atteint. Par conséquent, comme pour la  $\beta$ -lgE et la  $\beta$ -lgC, le HTE contient une plus faible quantité de protéines (52.5 %, p/p) que le HTC (92.5 %, p/p). L'analyse du tableau 2 montre que cette différence est due à une teneur plus élevée en lactose et en cendres du HTE, alors que peu de cendres et des traces de lactose

sont mesurées dans le HTC. Les teneurs en cendres différentes de 2 produits se reflètent au niveau des minéraux avec 15429 mg/100g pour le HTE et 2546 mg/100 g pour le HTC.

Si l'on examine plus en détail la composition en minéraux, on remarque que le HTE contient une quantité de citrate extrêmement élevée (8469 mg/100 g). Ce citrate a été ajouté sous forme d'acide citrique lors de la purification de la  $\beta$ -lg pour co-précipiter l' $\alpha$ -la, la BSA et les Igs (Léonil et al., 1997). La diafiltration réalisée juste avant l'hydrolyse devait éliminer cet excès de citrate, mais on peut penser qu'il se trouvait alors fixé aux protéines chargées de la solution, ce qui a empêché son passage à travers la membrane. La formation d'une couche de polarisation à l'interface membrane-solution provoquée par l'accumulation d'espèces chargées, a aussi pu contribuer au phénomène de rétention.

Le sodium est présent en grande quantité dans les 3 hydrolysats. Il provient principalement du NaOH ajouté en cours d'hydrolyse pour maintenir le pH à 8 (pH-stat). La  $\beta$ -lgC, ne contenait en effet que 1.8 % de cendres avant hydrolyse alors que ce taux s'élève à 3 % dans le HTC. Le dosage des minéraux montre uniquement la présence de sodium (2546 mg/100 g) et l'on peut donc considérer qu'il est le premier responsable de cette hausse de la teneur en cendres. De même, le *Bipro* est passé de 2.0 % de cendres à 6.2 % après hydrolyse, avec 2081 mg/100g de sodium (Pouliot et al., 1999). Le cas du HTE est particulier en ce sens qu'il contient deux fois plus de sodium que le HTC (4269 mg/100 g) pour un même degré d'hydrolyse (10.8 %, tableau 3). Ceci s'explique par le fait qu'en fin de diafiltration, les pH des deux batchs de  $\beta$ -lgE étaient encore très bas (3.78 et 3.68) puisqu'il restait beaucoup de citrate. Pour cette raison, une grande quantité de NaOH a du être ajoutée afin d'ajuster le pH à 8 avant de débiter l'hydrolyse. Ce n'était pas le cas pour la  $\beta$ -lgC dont le pH s'élevait déjà à 6.7 avant ajustement.

Enfin, on remarque que le HTE et le HT *Bipro* contiennent une quantité assez élevée d'ions chlorures (1622 et 1399 mg/100 g respectivement) alors que le HTC n'en contient pas. Cette quantité est trop importante pour s'expliquer par l'ajout de  $\text{CaCl}_2$  dans le substrat afin de stabiliser la conformation et l'activité de la trypsine. De plus, si c'était le cas, la même quantité de chlorures serait détectée dans le HTC. On peut penser qu'il s'agit d'un résidu



des solutions de lavage chlorées employées pour nettoyer les membranes d'UF. L'absence de chlorures dans le HTC s'explique par l'emploi d'une procédure automatisée qui permet de contrôler la quantité de chlore résiduelle et qui n'était pas en place lors de la préparation du HTE et du HT *Bipro*.

### **3.2. Effet du substrat sur le profil peptidique des hydrolysats totaux**

L'analyse de la distribution des poids moléculaires des peptides déterminée par HPSEC, révèle d'importantes différences entre les trois HT (figure 1). Pour un même degré d'hydrolyse de 10.8 % mesuré par pH-stat, le HTE contient deux fois moins de peptides inférieurs à 2000 Da (23.13 %) que le HTC (46.31 %). Logiquement, la proportion de peptides de haut poids moléculaire (entre 10000 et 5000 Da) est deux fois plus élevée dans le HTE (24.91 %) que dans le HTC (10.48 %). Il faut noter que le ratio enzyme : substrat était seulement de 1 : 90 dans le HTE tandis qu'il s'élevait à 1 : 100 dans le HTC, ce qui a pu faciliter la production de petits peptides dans ce dernier. De plus, le citrate présent en concentration élevée dans le HTE est capable de piéger le calcium sous forme de  $\text{Ca}_3(\text{Cit})_2$ . L'enzyme se trouvait ainsi privée d'un facteur contribuant à stabiliser sa conformation d'où une diminution de son activité. En outre, la forte teneur en sels du HTE pouvait permettre la formation de ponts salins entre les peptides libérés en cours d'hydrolyse. Ces liaisons, en plus des interactions hydrophobes, provoquent l'agrégation des peptides, rendant certains sites de coupures inaccessibles à l'enzyme.

Il faut aussi noter que les peptides du HTE et du HTC pouvaient avoir une solubilité différente dans la phase mobile durant l'analyse par HPSEC, ce qui a pu accentuer les différences observées. Enfin, bien que les valeurs de DH mesurées par pH-stat soient similaires pour les hydrolysats HTE et HTC, il est possible que la forte teneur en minéraux de la  $\beta$ -lgE ait affecté la mesure du DH en cours de réaction. Une analyse du DH par une autre méthode telle que l'OPA auraient permis de déterminer si les différences observées dans les profils HPSEC du HTE et du HTC pouvaient s'expliquer uniquement par leur

différence de DH. A l'inverse, l'emploi de l'UF pour stopper l'hydrolyse a eu pour effet de réduire les différences entre les HT, en éliminant tous les peptides supérieurs à 10000 Da.

L'hydrolysate de *Bipro* présente un profil peptidique totalement différent de celui du HTE et du HTC. Plus des deux tiers des peptides ont un poids moléculaire inférieur à 2000 Da et seulement 3 % d'entre eux dépassent les 5000 Da. Le degré d'hydrolyse est pourtant beaucoup plus faible (5.6 %) et le seuil de coupure de la membrane d'UF utilisée pour stopper la réaction est le même que dans les autres cas (10000 Da) avec un système identique. Cependant, l'enzyme utilisée (trypsine PTN-6.0S, De Novo Nordisk) est moins pure que la trypsine VI (Innovatech). Elle contient notamment de la chymotrypsine qui a pu recouper les peptides libérés par la trypsine. De plus, le *Bipro* étant un isolat de protéines de lactosérum, il contient 93.3 % (p/p) de protéines dont environ 80 % de  $\beta$ -lg, 16 % d' $\alpha$ -la et 4 % de BSA. Sa teneur en  $\alpha$ -la est donc plus élevée que celle des poudres de  $\beta$ -lgE et C. Or l' $\alpha$ -la, contrairement à l' $\beta$ -lg, est sensible à la chymotrypsine (24 sites de coupures potentiels), et a donc pu générer de petits co-peptides.

Les chromatogrammes de la figure 2 présentent les analyses de RP-HPLC en  $C_{18}$  réalisées sur le HTE et le HTC. Malgré une dilution identique des deux concentrés de  $\beta$ -lg (1% sur base poudre, p/v), l'absorbance du HTC est nettement supérieure à celle du HTE. Cette différence reflète la plus forte teneur du HTC en protéines (92.5 vs 52.5 %). Par contre, pour un même DH, les profils peptidiques des deux hydrolysats sont semblables. La méthode de purification et surtout le degré de pureté de la  $\beta$ -lg n'a donc pas eu d'effet qualitatif majeur sur la composition en peptides des hydrolysats tryptiques résultants. Le profil du HT *Bipro* est quant à lui différent puisqu'il s'agit d'un substrat différent.

**Tableau 1 : Composition en protéines des concentrés de  $\beta$ -lactoglobuline expérimentale ( $\beta$ -lgE) et de  $\beta$ -lactoglobuline commerciale ( $\beta$ -lgC)**

Composition <sup>a</sup> en protéines	Proportion relative (%)	
	$\beta$ -lgE	$\beta$ -lgC
$\beta$ -lactoglobuline	95.3	83.9
$\alpha$ -lactalbumine	1.8	12.7
BSA	2.9	3.4
Teneur <sup>b</sup> en protéines totale (%, p/p)	66.7	98.2

<sup>a</sup> : déterminée par RP-HPLC sur colonne C<sub>4</sub>

<sup>b</sup> : déterminée par la méthode Kjeldahl sur base sèche

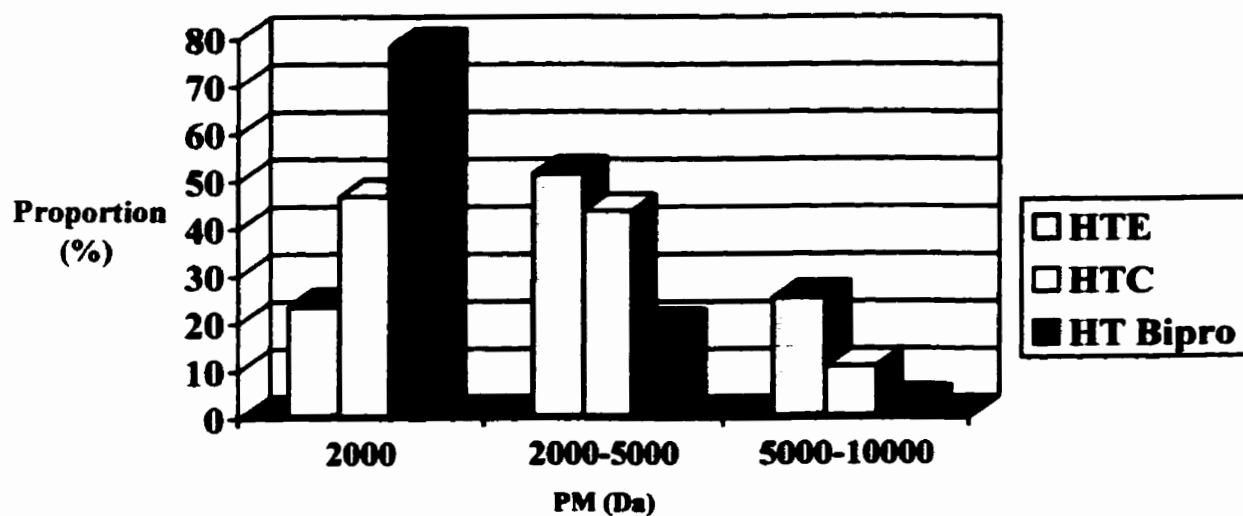
**Tableau 2 : Composition des trois hydrolysats (HTE, HTC et HT Bipro) obtenus par hydrolyse trypsique**

Composition	HTE	HTC	HT Bipro (Pouliot et al., 1999)
Protéine (% p/p)	52.5	92.5	81.2
Lactose (% p/p)	26.5	< 0.1	nd
Lipide (% p/p)	nd	0	nd
Humidité (% p/p)	4.5	4.5	nd
Cendres (% p/p)	15	3	6.2
Ions (mg/100 g)			
Cl	1622	< 10	1399
Cit	8469	< 10	357
P <sub>0</sub> <sub>4</sub>	869	< 10	19
Ca	170	< 10	381
Na	4269	2546	2081
K	< 10	< 10	177
Mg	30	< 10	< 10
Ions totaux	15429	2546	4414
DH <sup>a</sup> (%)	10.8	10.8	5.6

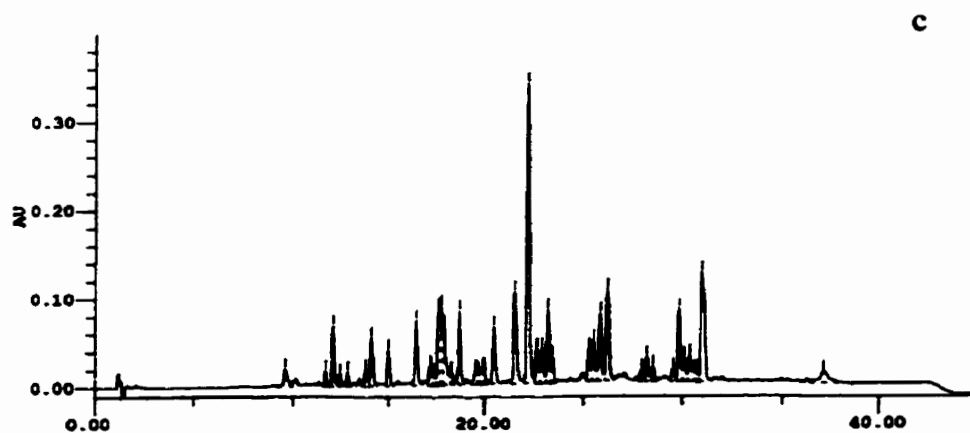
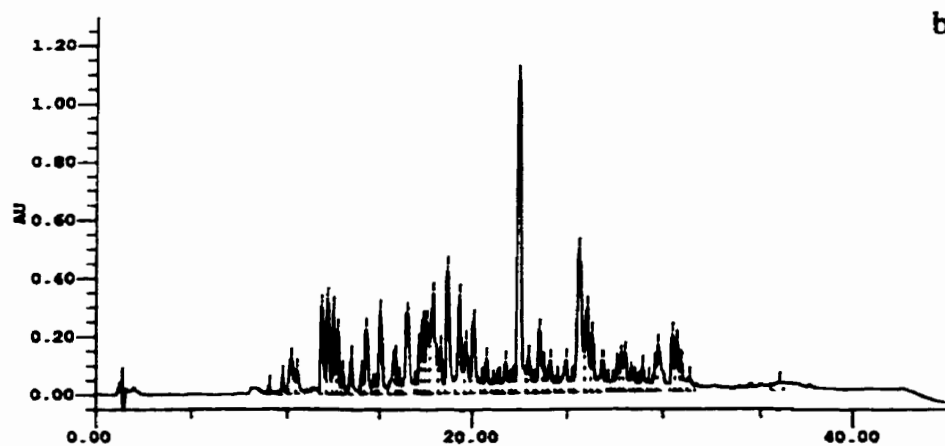
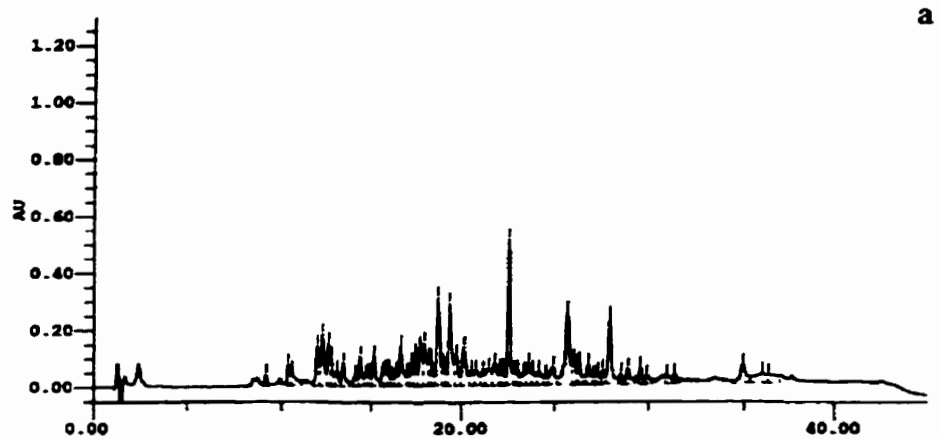
nd : non déterminé

<sup>a</sup> : degré d'hydrolyse déterminé par pH-stat

**Figure 1 : Distribution des poids moléculaires (%) des composés protéiques du HTE, HTC et du HT Bipro**



**Figure 2 : Profils chromatographiques (RP-HPLC) du HTE (a), du HTC (b) et du HT Bipro (c)**



#### 4. CONCLUSION

Cette étude a permis d'évaluer l'impact de la composition de la matière première sur celle des hydrolysats tryptiques obtenus. La composition du substrat de départ détermine directement la teneur en protéines, en sels et en lactose ainsi que les proportions des différents peptides de l'hydrolysate résultant. Par contre, sur le plan strictement qualitatif, les conséquences sont nettement moins importantes. En effet, la méthode de purification de la  $\beta$ -lg et son degré de pureté ont une influence très relative sur le profil peptidique de l'hydrolysate. Suite à l'arrêt de l'hydrolyse par UF, nous avons obtenus des chromatogrammes semblables pour le HTE et le HTC. Il serait cependant intéressant de déterminer le degré de lactosylation de la  $\beta$ -lgE et de la  $\beta$ -lgC afin de comparer l'effet dénaturant sur la protéine des deux procédés de purification. Dans le cas d'études où l'on souhaite travailler avec une  $\beta$ -lg sous forme native, le procédé de Léonil et al. (1997) peu alors s'avérer mieux approprié. De plus, des études supplémentaires devraient être réalisées afin de mettre au point une méthode de diafiltration permettant d'éliminer l'excès de sels dans la  $\beta$ -lgE. Les minéraux nuisent en effet à l'hydrolyse : ils modifient probablement la solubilité des peptides et le citrate lie le calcium nécessaire à la trypsine. Enfin, peut-être affectent-ils la détermination du DH par pH-stat, ce qui devrait être contrôlé par l'utilisation d'une deuxième méthode telle que l'OPA.

## 5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier App. Sci., New York, U.S.A.
- AOAC 1980. Official Methods of Analysis, 13<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Chiba, H.; Yoshikawa, M. 1986. Biologically functional peptides from food proteins : new opioid peptides from milk proteins. Dans Protein Tailoring for Food and Medical Uses, (R.E. Feeney et J.R. Whitaker ed.) New York. pp 123-153.
- Dalgalarondo, M.; Chobert, J.M.; Dufour, E.; Bertrand-Harb, C.; Dumont, J.P.; Haertlé, T. 1990. Characterisation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B tryptic peptides by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft*, 45(40), 212-216.
- Eigel, W.N.; Butler, J.E.; Ernstrom, C.A.; Farrel, H.M.; Harwalker, V.R.; Jenness, R.; Whitney, R.Mcl. 1984. Nomenclature of proteins-1. (B.J.F. Hudson ed.) Applied Science Publ. London and New Jersey. pp 1-60.
- Fox, P.F.; Morissey, P.A.; Mulvihill, D.M. 1982. Chemical and enzymatic modification of food proteins. Dans : Developments in food proteins-1. (B.J.F. Hudson ed.) Applied Science Publ. London and New Jersey. pp 1-60.
- IDF. 1986, Provisional Standard 20A. Int. Dairy Fed., Brussels.
- Kinsella, J.E.; Whitehead, D.M.; Brady, J.; Bringe, N.A. 1989. Milk protein : possible relationship of structure and function. Dans : Developments in Dairy Chemistry, Vol 4, Elsevier Applied Science, New York. 55.



- Léonil, J.; Molle, D.; Fauquant, J.; Maubois, J. L.; Pearce, R.J.; Bouhallab, S. 1997. Characterisation by ionisation mass spectrometry of lactosyl  $\beta$ -lactoglobuline conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. *J. Dairy Sci.*, 80, 2270-2281.
- Pouliot, Y.; Gauthier, S.F.; Bard, C. 1995. Skimmilk solids as substrat for the preparation of casein enzymatic hydrolysates. *J. Food Sci.*, 60(1), 111-116.
- Pouliot, Y.; Wijers, M.C.; Gauthier, S.F.; Nadeau, L. 1999. Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *J. Membr. Sci.*, 4095, 1-10.
- Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F.; Mollé, D.; Léonil, J. 1992. Interfacial properties of tryptic peptides of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, 40(4), 669-675.
- Reddy, M.; Kella, N.K.D.; Kinsella, J.E. 1988. Structural and conformational basis of the resistance of  $\beta$ -lactoglobuline to peptic and chymotryptic digestion. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 737-741.
- Yamauchi, K. 1992. Biologically functional proteins of milk and peptides derived from milk proteins *International Dairy Federation Bulletin*. 272 : 51-58.

## **CHAPITRE 3**

### **ÉTUDE DU FRACTIONNEMENT D'UN HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE $\beta$ -LACTOGLOBULINE PAR NANOFILTRATION**

## **1. INTRODUCTION**

Les protéines du lactosérum, et plus particulièrement leurs hydrolysats, suscitent depuis une vingtaine d'années un intérêt grandissant à travers le monde. Grâce à leurs propriétés nutritionnelles, biologiques et fonctionnelles si particulières, elles occupent une place de choix dans la gamme des ingrédients protéiques alimentaires (Kinsella et Whitehead, 1989) et trouvent des applications variées dans le secteur des cosmétiques ou de la pharmacologie. Afin d'obtenir une activité fonctionnelle maximale et reproductible, une étape préliminaire de fractionnement et/ou de purification des hydrolysats est essentielle. Le procédé d'ultrafiltration (UF) permet aisément de stopper l'hydrolyse en séparant l'enzyme et les protéines non hydrolysées des peptides, acides aminés et minéraux. Par contre, cette technique basée sur l'exclusion stérique n'est pas assez fine pour séparer entre elles des molécules de taille voisine ayant de faibles différences de charge. La chromatographie permet de réaliser une telle séparation mais son utilisation nécessite un investissement élevé et peut amener une dilution des protéines éluées, d'où un accroissement des coûts de concentration et de séchage. Dans ce contexte, la haute sélectivité des membranes de nanofiltration en fait un outil de choix pour séparer et purifier des mélanges de peptides et d'acides aminés tels que les hydrolysats (Garem, 1995).

La nanofiltration (NF) est un procédé de séparation membranaire relativement récent qui permet de séparer des composés de faible poids moléculaire selon leur taille et leur charge. Selon l'ancienne définition assez restrictive de Erikson (1988), cette double sélectivité est basée sur l'emploi de membranes chargées négativement dont le seuil de coupure se situe entre 200 et 1000 Da. Le transport à travers la membrane se fait à la fois par convection, diffusion et électromigration. Les mécanismes de séparation du solvant et du soluté sont quant à eux généralement décrits en terme d'interactions ioniques et/ou stériques (Chaufer et al., 1996). Dans le cas de molécules neutres, la séparation repose uniquement sur la différence de taille entre les molécules de soluté et les pores membranaires. Ces mécanismes d'exclusion stérique ont été modélisés à partir de la loi de Ferry (1936) corrigée par Zeman et Wales (1981).

Du fait de l'intervention d'interactions ioniques supplémentaires, le cas des molécules chargées est plus complexe. En effet, la transmission du soluté sera différente selon qu'il est de même charge que la membrane (co-ion) ou de signe opposé (contre-ion). De part leur charge, les contre-ions vont se trouver plus concentrés à l'interface membrane/solution que dans la solution elle-même et inversement pour les co-ions. Cette différence de concentration va générer une différence de potentiel à l'interface membrane/solution appelée potentiel de Donnan. Selon la théorie de Donnan, sous des conditions d'équilibre, l'électroneutralité et l'égalité des potentiels électrochimiques doivent être maintenus constants dans tout le système (Donnan, 1911). Cette théorie est toutefois difficilement applicable aux solutions contenant plusieurs solutés positifs, négatifs et neutres car les phénomènes d'interaction et de compétition compliquent infiniment l'interprétation des résultats. Martin-Orue et al. (1998) ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de séparations de ces solutions mixtes en énonçant deux grands principes : plutôt que la charge globale nette, la distribution des charges sur la séquence de chaque peptide doit être prise en compte afin d'expliquer sa transmission, et l'électroneutralité doit toujours être maintenue dans le système. Cet équilibre est fonction de la charge de la membrane, du co-ion et du contre-ion, ainsi que de leur environnement, c'est-à-dire du pH et dans une moindre mesure de la force ionique (Garem et al., 1996).

La plupart des études portant sur l'étude des mécanismes de transfert des molécules chargées en NF reposent sur l'utilisation de solutions modèles parfaitement caractérisées, mais très éloignées de la complexité réelle d'un hydrolysate (Tsuru et al., 1994). A partir de solutions un peu plus complexes, Garem et al. (1997) sont parvenus à montrer que la séparation des acides aminés acides se fait à bas pH (<3), tandis que celle des acides aminés basiques se fait à pH élevé (>9). Le pH optimum pour une bonne séparation des peptides se situe aux alentours de 8 où la transmission des peptides basiques est très élevée, intermédiaire pour les neutres, et faible pour les acides (Garem et al., 1998). Suite à des travaux préliminaires (Wijers et al., 1998), Pouliot et al. ont réalisé en 1999 la première étude portant sur la séparation par NF de peptides d'un hydrolysate. L'hydrolysate avait été préparé à partir d'un isolat de protéines du lactosérum traité à la trypsine puis ultrafiltré sur

une membrane de 10 KDa afin de stopper la réaction. Parmi les 5 membranes de NF testées, la SG13 (Osmonics), composée d'acétate de cellulose et possédant un seuil de coupure situé entre 1000 et 5000 Da, a fait preuve des meilleures propriétés de séparation combinées aux plus hauts flux. Elle a par conséquent été retenue pour les études de l'effet du pH (entre 5 et 9) et de la force ionique (0 ou 0.5 M de NaCl). Ils ont ainsi pu constater qu'une élévation de pH augmentait le flux et la transmission d'azote, tout en diminuant l'encrassement. L'addition de NaCl par contre, augmentait la perméabilité mais aussi l'encrassement. L'effet de charge ainsi que les principes de Donnan étaient illustrés par le fait que les peptides neutres et positifs traversaient la membrane alors que ceux chargés négativement étaient retenus. La meilleure séparation entre peptides acides et basiques était observée à pH 9, à faible force ionique, sans addition de sels. Ces conclusions montrent l'intérêt de nouvelles investigations dans la zone alcaline de pH afin de déterminer les conditions optimales d'une séparation des peptides. Plusieurs peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la  $\beta$ -lg, tel que le 142-148 ou le 146-148, possèdent en effet un point isoélectrique entre 9 et 11.

L'objectif de ce travail était donc d'approfondir notre compréhension des mécanismes de séparation des peptides par NF, et ce dans un mélange complexe tel qu'un hydrolysats trypsique de  $\beta$ -lactoglobuline. Au vue des résultats obtenus par Pouliot et al. (1999), nous avons opté pour la membrane SG13 (Osmonics). Le paramètre le plus intéressant à étudier était le pH que nous avons fait varier entre 3 et 11 afin d'explorer les zones acides et basiques extrêmes.

## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1. Préparation de l'hydrolysats trypsique de $\beta$ -lactoglobuline**

Un lot d'hydrolysats a été préparé à partir de  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) commerciale (Daviisco Foods International Inc., Le Sueur, MN, USA; lot JE 002-8-922) contenant 98.2 % de protéines sur base sèche dont 85 % de  $\beta$ -lg. La poudre de  $\beta$ -lg a été réhydratée à 10 % dans de l'eau distillée. L'hydrolyse trypsique (trypsine VI Inovatech Inc., Abbotsford, BC, Ca) a été menée à 40 °C, en mode pH-stat, et à un ratio enzyme : substrat de 1 : 100. La réaction d'hydrolyse a été stoppée après 50 min à un degré d'hydrolyse (DH) de 10.8 % en effectuant une ultrafiltration à l'aide d'une cartouche de fibres creuses possédant un seuil de coupure de 10 KDa (PM 10, Romicon Inc., Woburn, MA, USA). Le perméat ainsi collecté était débarrassé de l'enzyme et des protéines non-hydrolysées. La distribution des poids moléculaires des composés peptidiques entre < 2000, 2000 - 5000 et 5000 - 10000 g/mol<sup>-1</sup> était respectivement de 46.31, 43.20 et 10.48 %. L'hydrolysats total (HT), contenant 92.5 % (p/p) de protéines, a par la suite été lyophilisé et stocké à - 20 °C pour usage ultérieur dans les essais de nanofiltration.

En parallèle, une hydrolyse de  $\beta$ -lg purifiée au laboratoire selon le procédé de Léonil et al. (1997) a été réalisée dans des conditions identiques. Cependant, son utilisation dans les essais de nanofiltration s'est avérée impossible du fait de sa forte teneur en sels. En effet, la force ionique élevée qui en résultait, masquait les effets de charges que l'on cherchait à mettre en évidence.

## **2.2. Essais de nanofiltration**

Les essais de filtration ont été effectués en mode tangentiel au moyen d'une cellule de type SEPA CF (Osmonics Minnetonka, MN, USA). Le matériau membranaire utilisé (SG13, Osmonics) était composé d'acétate de cellulose et possédait des groupements chargés négativement. Son seuil de coupure se situait entre 1000 et 5000 Da (spécifications fournies par le manufacturier). Les coupons de membrane d'une surface de  $1.55 \times 10^{-2} \text{ m}^2$  étaient conditionnés avant emploi par immersion durant 12 h dans de l'eau purifiée  $18 \text{ M}\Omega$  (Modulab Analytical, Fisher Scientific, Montréal, Qc, Ca). Une membrane neuve était utilisée pour chaque nouvelle expérience. A noter qu'une série d'essais a aussi été réalisée avec la membrane SN4 (Osmonics). Elle n'a pas été retenue en raison de son seuil de coupure trop élevé (8000 à 10000 Da) qui ne permettait pas de réaliser une séparation sélective des peptides de l'hydrolysate.

La solution utilisée pour les essais de nanofiltration a été préparée en rehydratant l'hydrolysate HT à une teneur finale de 0.1 % de protéines dans de l'eau distillée. Cette concentration a été choisie de sorte que la force ionique soit très faible. Le pH était ajusté à la température de l'essai par addition de HCl ou de NaOH (solutions volumétriques 1 N, Anachemia Canada, Montréal, Qc., Ca). Les 5 pH étudiés (3, 5, 7, 9 et 11) étaient testés en triplicata dans un ordre aléatoire. La température (T) du module et de la phase mobile était ajustées à 40 °C. La vitesse de recirculation (V) était maintenue constante par régulation manuelle à  $0.33 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  et la pression transmembranaire (PT) à  $5 \times 10^5 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$ .

### **2.2.1. Procédures des essais de filtration**

Le flux à l'eau (Jw) était déterminé par recirculation d'eau distillée à 40 °C durant 20 min. Le calcul du Jw était basé sur les mesures des volumes de perméat collectés entre les minutes 10 et 15 ainsi que 15 et 20. Pour chaque essai, 2 L de solution étaient filtrés

jusqu'à atteindre un facteur de concentration volumique (FCV) de 2, soit une durée de 18 à 22 min. Le volume de perméat était mesuré chaque minute afin de déterminer le flux de perméation  $J_f$ . Le rétentat et le perméat étaient recueillis à des fins d'analyses, de même qu'un échantillon de la solution de départ.

Avant et après chaque essai, l'installation était nettoyée selon la procédure suivante basée sur celle de Garem et al. (1996) :

- NaOH 0.01 mol.L<sup>-1</sup> (pH 12) + NaOCl (0.025 %) en recirculation pendant 30 min;
- Rinçage jusqu'à neutralité à l'eau désionisée en circuit ouvert;
- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 mol.L<sup>-1</sup> (pH 2) en recirculation pendant 30 min;
- Rinçage jusqu'à neutralité à l'eau désionisée en circuit ouvert.

Le flux à l'eau  $J_w$  était à nouveau mesuré dans des conditions identiques à celles du début d'expérience. Il est à noter qu'en travaillant à une concentration de 0.1 % de protéines nous n'avions pas de colmatage irréversible de la membrane. Par conséquent aucune mesure de  $J_w'$  (flux à l'eau après rinçage à l'eau désionisée 15 min.) n'a été réalisée.

### 2.2.2. Calculs

Les flux à travers la membrane étaient calculés à partir de l'équation :

$$J = \frac{1}{A_m} \frac{dV}{dt} \quad [1]$$

où :

$A_m$  = surface de la membrane (m<sup>2</sup>)

$dV/dt$  = Volume de perméat  $dV$  collecté durant l'intervalle de temps  $dt$  (m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>)



Les résistances membranaires hydrauliques de la membrane propre ( $R_m$ ) et de colmatage total ( $R_f$ ) étaient estimées à partir des flux de perméation à  $T = 40\text{ °C}$ ,  $V = 0.33\text{ m.s}^{-1}$ , à  $PT = 5 \times 10^5\text{ N.m}^{-2}$  et au pH de l'essai, par les relations suivantes :

$$R_m = \frac{PT}{\mu_w \cdot J_w} \quad [2]$$

$$R_f = \frac{PT}{\mu \cdot J_f} - R_m \quad [3]$$

où :

$J_w$  = Flux de perméation à l'eau désionisée avant essai ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )

$J_f$  = Flux de perméation ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )

$\mu_w$  = Viscosité dynamique de l'eau à la température considérée (Pa.s)

$\mu$  = Viscosité dynamique du perméat à la température considérée (Pa.s)

(à noter que dans notre cas  $\mu_w = \mu$ )

$PT$  = Pression transmembranaire (Pa)

### 2.3. Méthodes analytiques

La teneur totale en azote des échantillons a été déterminée en duplicata sur base humide et triplicata sur base sèche par la méthode Kjeldahl (IDF; 1986) à l'aide d'un appareil Büchi 430 équipé d'une unité de distillation 321 (Brinkman Instruments, Montréal, Qc, Ca).

Les analyses de chromatographie liquide haute-performance en phase inverse (RP-HPLC) ont été réalisées au moyen d'une colonne Nova-Pak  $C_{18}$  (3.9 i.d. X 150 mm, Waters, Milford, MA, USA). Les conditions étaient les suivantes : débit  $1\text{ mL.min}^{-1}$ ; température de la colonne  $40\text{ °C}$ ; solvant A, 0.11 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) dans de l'eau; solvant B, 20 % (v/v) d'acétonitrile 80 % (v/v) d'eau et 0.1 % (v/v) de TFA; solvant C, 100 % d'acétonitrile. L'élution des échantillons se faisait selon le gradient présenté au tableau

1. L'absorbance était mesurée à 220 nm. Les échantillons destinés à l'analyse HPLC ont tous été filtrés sur une membrane de Nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  (Lida, Kenosha, WI).

**Tableau 1 : Gradient d'élution des analyses d'HPLC**

Temps (min)	%A	%B	%C
0	100	0	0
60	25	75	0
76	15	85	0
88	0	100	0
91	0	0	100
96	0	0	100
100	100	0	0
110	100	0	0

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Effet du pH sur la perméabilité membranaire

Le tableau 2 présente les valeurs des flux et des résistances de la membrane SG13 en fonction du pH. Il apparaît qu'une élévation du pH de 3 à 11 entraîne une augmentation significative du flux de perméation  $J_f$  (48.2 ( $\pm 3.7$ ) à 58.4 ( $\pm 1.0$ )  $\times 10^{-6}$   $\text{m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) accompagnée d'une diminution de la résistance membranaire  $R_f$  due à l'encrassement (1.6 à  $-0.2 \times 10^{12} \cdot \text{m}^{-1}$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux de Garem et al. (1998), de Martin-Orue et al. (1998) ainsi que de Pouliot et al. (1999). Le meilleur modèle pour tenter de décrire le transfert du solvant en NF est celui des «résistances en séries» (Cheryan, 1986; van der Waal et al., 1989):

$$J_f = \frac{(PT - \sigma \Delta \pi)}{\mu(R_m + R_f)} \quad [4]$$

où :

$\sigma$  : coefficient de rejet de la membrane ( $0 < \sigma < 1$ )

$\Delta \pi$  : gradient de pression osmotique de part et d'autre de la membrane (Pa)

Le paramètre  $R_f$  prend en compte tous les phénomènes contribuant à l'encrassement de la membrane tels que : la formation d'une couche de polarisation à l'interface membrane/solution, la formation d'un gel, ou bien encore l'adsorption du soluté sur la membrane. Or, à pH 9, et à fortiori à pH 11, la membrane est chargée négativement, alors que les peptides sont pour la plupart chargés négativement ou neutres. Par conséquent les phénomènes de répulsion entre la membrane et les peptides (co-ions) sont plus intenses avec pour conséquence un encrassement ( $R_f$ ) minimal. À l'inverse, à pH inférieur à 7, la proportion de peptides chargés positivement est plus élevée tandis que la membrane est encore chargée plutôt négativement. Il y a donc adsorption des peptides sur la membrane et possibilité de formation d'une couche de polarisation d'où une augmentation de  $R_f$ . On peut aussi penser que le pH influence la solubilité des peptides. En effet, lorsque les peptides sont de charge opposée (pH inférieur à 7), des phénomènes d'agrégation peuvent se produire par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques et hydrophobes et encrasser la membrane. Par contre, à pH plus élevé (9, 11) , les forces de répulsions entre peptides prédominent sur celles d'attraction ce qui diminue la tendance à l'agrégation.

D'après la relation [4], le gradient de pression osmotique existant de part et d'autre de la membrane ( $\Delta \pi$ ) contribue, en augmentant, à élever le flux  $J_f$ . Dans notre cas, la pression osmotique est très faible puisque nous travaillons à faible concentration (0.1%). De plus, le pH de la solution avant ajustement étant intermédiaire (7.8), l'ajout de NaOH pour augmenter le pH est aussi important que celui de HCl pour le diminuer. La pression osmotique n'est donc pas un paramètre prépondérant à prendre en compte pour interpréter l'évolution du flux de perméation aux différents pH.

### 3.2. Effet du pH sur la transmission du soluté

Le tableau 3 présente l'évolution en fonction du pH du rapport «aire totale du chromatogramme du perméat / aire totale du chromatogramme de la solution de départ» obtenues par RP-HPLC en C<sub>18</sub>. Ce rapport reflète donc la transmission de l'ensemble des peptides solubles à travers la membrane selon le pH. Une chute significative se produit entre le pH 5 et 7. Or le point isoélectrique de la  $\beta$ -lactoglobuline se situe aux alentours de 5.2 ce qui signifie que la majorité des peptides de son hydrolysate augmentent leur charge négative à ce moment. Les phénomènes de répulsion membrane/peptides augmentent alors et la transmission globale diminue. Les variations du degré de solubilité des peptides en fonction du pH et la formation d'agrégats exposés précédemment doivent aussi être pris en compte comme le suggèrent les chromatogrammes présentés aux figures 1, 2 et 3.

En effet, l'analyse des chromatogrammes des solutions de départ montrent des différences selon le pH (3, 9 et 11). Dans tous les cas il s'agit du même HT qui a été réhydraté à la même concentration sur base protéique à différents pH. Lors de l'analyse en C<sub>18</sub> par RP-HPLC, les échantillons étaient tous dilués dans la phase mobile donc au même pH. Ces différences ne peuvent donc s'expliquer que par des différences de solubilité des peptides selon le pH dans les solutions de départ. Lorsqu'elles ont été filtrées sur une membrane de Nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  avant injection, les agrégats présents ont été retenus par le filtre. Ces pertes avant analyse sont la cause des différences observées entre les profils peptidiques des solutions de départ, car les peptides agrégés n'étaient pas les mêmes aux différents pH. Dans le cas des perméats, moins concentrés que la solution de départ, le même phénomène a dû se produire à moindre échelle lors de la préparation des échantillons, mais aussi lors de la filtration proprement dite avec la membrane de nanofiltration. C'est pourquoi les profils peptidiques des perméats sont différents de ceux des solutions de départ correspondantes. Le pH ne détermine donc pas uniquement l'état d'ionisation du soluté mais aussi sa solubilité. On peut donc en déduire que c'est l'état physico-chimique du peptide, c'est-à-dire sa solubilité, sa charge et sa taille, qui va permettre ou non son passage à travers la membrane. La sélectivité de la séparation dépend de l'interaction de l'ensemble de ces

facteurs en fonction du pH, ce qui rend l'interprétation des résultats difficile. Par contre, la solubilité représente un facteur supplémentaire qu'il est possible de faire varier en fonction du pH, de façon à faciliter ou non le passage du soluté à travers la membrane.

#### **4. CONCLUSION**

Cette étude a permis de confirmer l'importance de l'influence du pH sur les caractéristiques de séparation en NF. Dans le cas du fractionnement d'un hydrolysats tryptique de  $\beta$ -lg, une élévation du pH provoque une augmentation des phénomènes de répulsion entre la membrane et les peptides mais aussi entre peptides. L'encrassement des membranes est alors réduit tandis que la solubilité des peptides augmente. La conjugaison de ces deux phénomènes conduit à une augmentation des flux de perméation et à une diminution de la transmission de l'ensemble des peptides solubles à travers la membrane.

D'autre part, il a été démontré que la variation de la solubilité des peptides selon le pH était un phénomène à prendre en compte au même titre que l'effet de charge, pour tenter de comprendre les mécanismes de séparation en NF. C'est l'état physico-chimique du peptide, c'est-à-dire sa solubilité, sa charge et sa taille, qui va permettre ou non son passage à travers la membrane. La sélectivité de la séparation dépend donc de l'interaction de ces phénomènes en fonction du pH, ce qui rend l'interprétation des résultats difficile. Par contre, dans le but de purifier certaines fractions peptidiques bien précises, la solubilité peut être un atout, car connaissant le degré de solubilité d'un peptide selon le pH, on peut favoriser ou au contraire empêcher son passage à travers la membrane.

Enfin, la mise au point de méthodes analytiques permettant d'obtenir des chromatogrammes avec un pic individualisé pour chaque peptide, suivi d'analyses d'identification par MS, permettrait de calculer la transmission des différents peptides et donc de mieux comprendre l'ensemble des mécanismes mis en jeu.

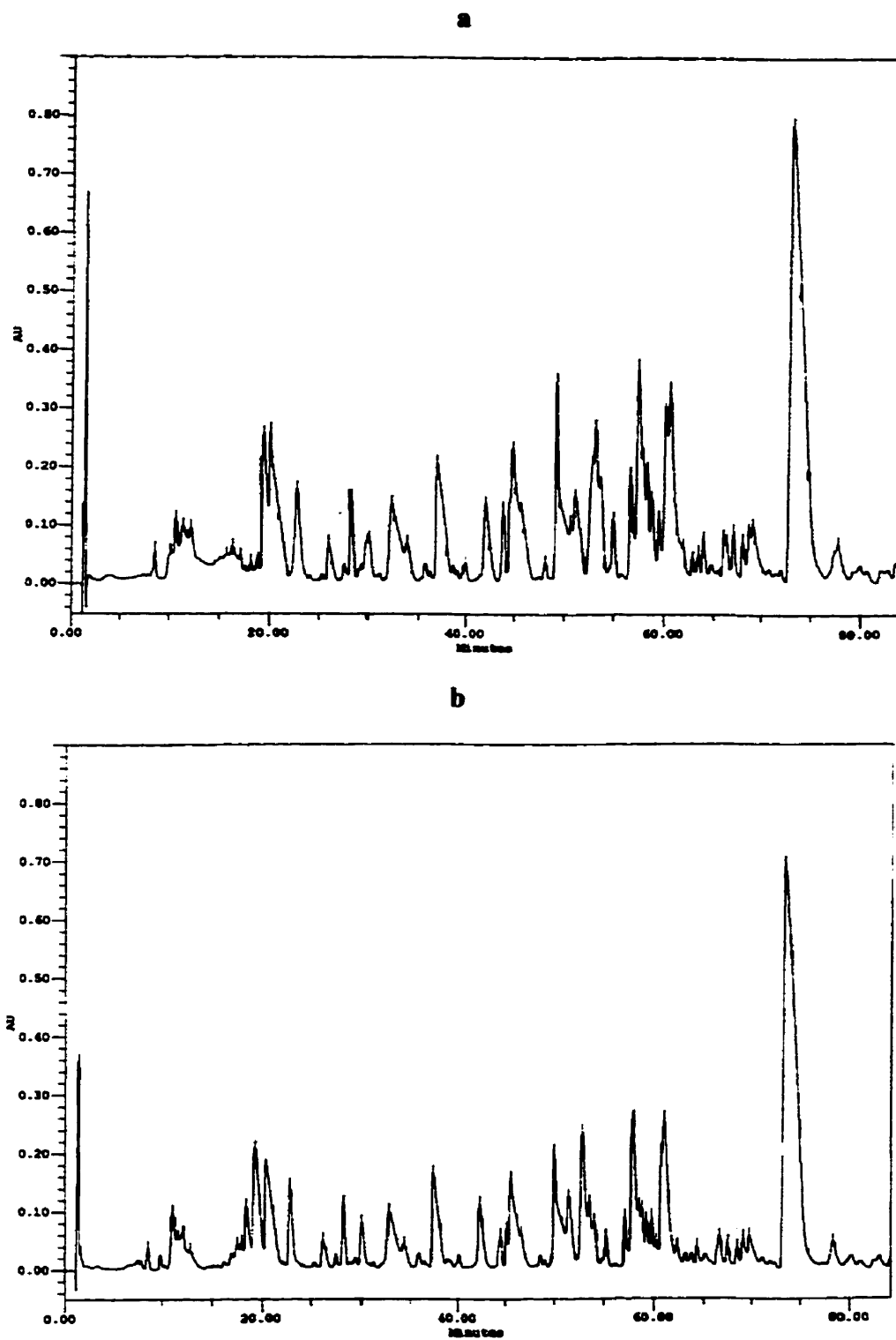
**Tableau 2 : Valeurs des flux de perméation à l'eau ( $J_w$ ), des flux de perméation ( $J_f$ ), des résistances membranaires hydrauliques de la membrane propre ( $R_m$ ) et de colmatage total ( $R_f$ ) en fonction du pH**

<b>pH</b>	<b><math>J_w</math></b> ( $10^{-6} \text{m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	<b><math>J_f</math></b> ( $10^{-6} \text{m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	<b><math>R_m</math></b> ( $10^{12} \text{m}^{-1}$ )	<b><math>R_f</math></b> ( $10^{12} \text{m}^{-1}$ )
<b>3</b>	53.4 ( $\pm 2.7$ )	48.2 ( $\pm 3.7$ )	14.2 ( $\pm 0.7$ )	1.6 ( $\pm 0.6$ )
<b>5</b>	55.2 ( $\pm 1.8$ )	47.8 ( $\pm 0.8$ )	13.8 ( $\pm 0.5$ )	2.1 ( $\pm 0.2$ )
<b>7</b>	57.7 ( $\pm 3.5$ )	52.9 ( $\pm 5.2$ )	13.2 ( $\pm 0.8$ )	2.1 ( $\pm 0.2$ )
<b>9</b>	54.5 ( $\pm 4.8$ )	54.4 ( $\pm 2.7$ )	14.0 ( $\pm 1.3$ )	0.0 ( $\pm 0.6$ )
<b>11</b>	57.3 ( $\pm 1.3$ )	58.4 ( $\pm 1.0$ )	13.2 ( $\pm 0.3$ )	-0.2 ( $\pm 0.5$ )

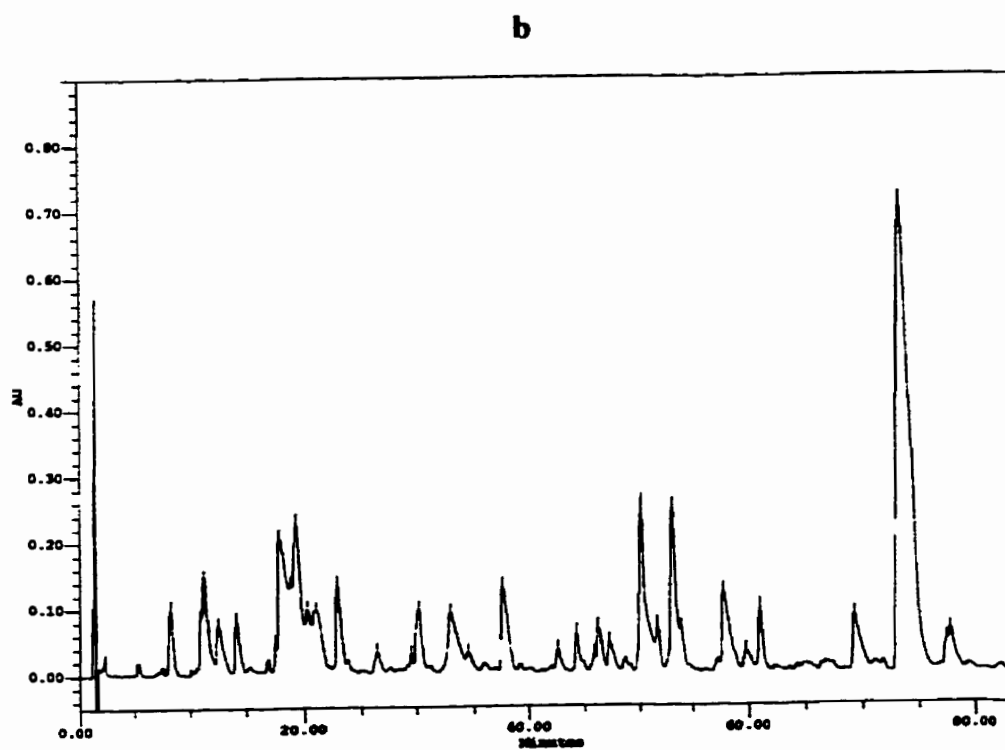
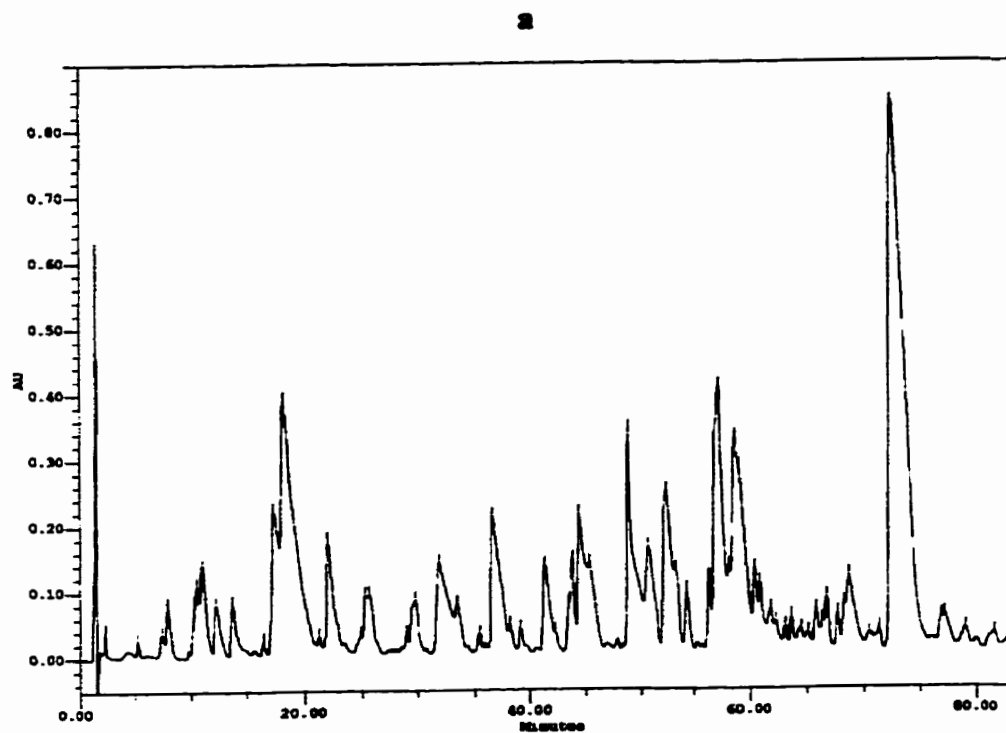
**Tableau 3 : Évolution en fonction du pH du rapport R : «aire totale des chromatogrammes du perméat / aire totale des chromatogrammes de la solution de départ» obtenus par RP-HPLC en  $C_{18}$**

<b>pH</b>	<b>pH 3</b>	<b>pH 5</b>	<b>pH 7</b>	<b>pH 9</b>	<b>pH 11</b>
<b>R</b>	<b>0.72</b> ( $\pm 0.06$ )	<b>0.71</b> ( $\pm 0.04$ )	<b>0.57</b> ( $\pm 0.02$ )	<b>0.41</b> ( $\pm 0.09$ )	<b>0.46</b> ( $\pm 0.08$ )

**Figure 1 : Profils chromatographiques (RP-HPLC) de la solution de départ à pH 3 (a) et du perméat à pH 3 (b)**

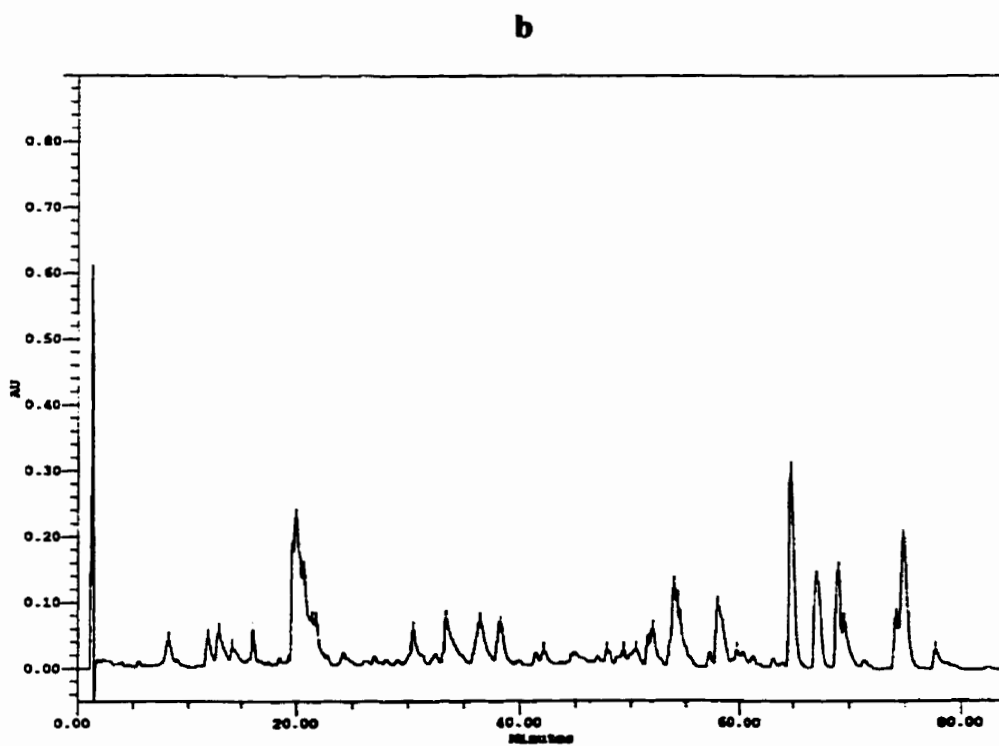
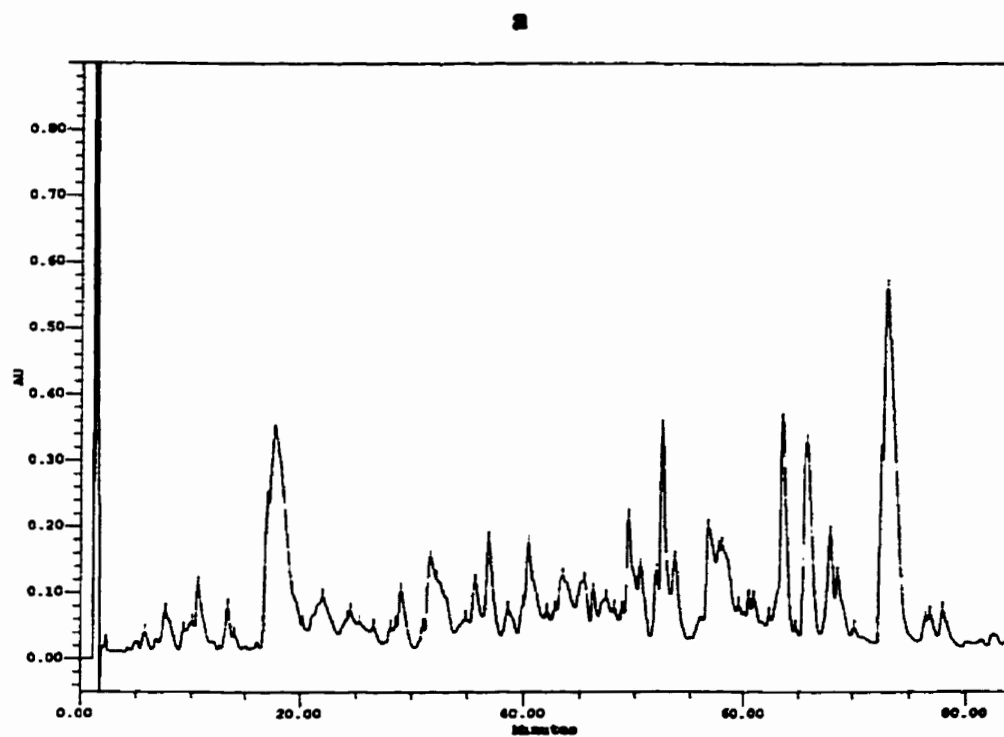


**Figure 2 : Profils chromatographiques (RP-HPLC) de la solution de départ à pH 9 (a) et du perméat à pH 9 (b)**





**Figure 3 : Profils chromatographiques (RP-HPLC) de la solution de départ à pH 11 (a) et du perméat à pH 11 (b)**



## 5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chaufer, B.; Rabiller-Baudry, M.; Guihard, L.; Daufin, G. 1996. Retention of ions in nanofiltration at various ionic strength. *Desalination*, 104, 37-46.
- Cheryan, M. 1986. *Ultrafiltration handbook*. Technomic publishing compagny Inc., Lancaster, Pennsylvania, 89-91.
- Donnan, F.G. 1911. Theorie of membrane equilibria and membrane potentials in the presence of non-dialysing electrolytes. A contribution to physical-chemical physiology. Traduction intégrale dans *J. Membr. Sci.*, 100, 45-55.
- Eriksson, P. 1988. Nanofiltration extends in the range of membrane filtration. *Environ. Prog.*, 7 (1), 58-62.
- Ferry, J.D. 1936. Ultrafilter membranes and ultrafiltration. *Chem. Rev.*, 18, 373-455.
- Garem, A.; Daufin, G.; Maubois, J.L.; Chaufer, B.; Léonil J. 1998. Ionic interactions in nanofiltration of  $\beta$ -casein peptides. *Biotechnol. Bioeng.*, 57 (1), 109-117.
- Garem, A.; Daufin, G.; Maubois, J.L.; Léonil J. 1997. Selective separation of amino acids with a charged inorganic nanofiltration membrane : effect of physicochemical parameters on selectivity. *Biotechnol. Bioeng.*, 54 (4), 291-302.
- Garem, A.; Léonil J.; Daufin, G.; Maubois, J.L. 1996. Nanofiltration d'acides aminés sur membranes organiques : influence des paramètres physico-chimiques et de la pression transmembranaire sur la sélectivité. *Le Lait*, 76, 267-281.

- Garem, A. 1995. Applications de la nanofiltration au fractionnement des hydrolysats peptidiques. Thèse ENSA, Rennes. France.
- IDF. 1986, Provisional Standard 20A. Int. Dairy Fed., Brussels.
- Kinsella, J.E.; Whitehead, D.M.; Brady, J.; Bringe, N.A. 1989. Milk protein : possible relationship of structure and function. Dans : Developments in Dairy Chemistry, Vol 4, Elsevier Applied Science, New York, 55.
- Léonil, J.; Molle, D.; Fauquant, J.; Maubois, J. L.; Pearce, R.J.; Bouhallab, S. 1997. Characterisation by Ionisation Mass Spectrometry of lactosyl  $\beta$ -lactoglobuline conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. J. Dairy Sci., 80, 2270-2281.
- Martin-Orue, C.; Bouhallab, S.; Garem, A. 1998. Nanofiltration of amino acid and peptide solutions : mechanisms of separation. J. Membr. Sci., 142, 225-233.
- Pouliot, Y.; Wijers, M.C.; Gauthier, S.F.; Nadeau, L. 1999. Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. J. Membr. Sci., 4095, 1-10.
- Tsuru, T.; Shutou, T.; Nakao, S.I.; Kimura, S. 1994. Peptide and amino acid separation with nanofiltration membranes. Sep. Sci. Technol., 29 (8), 971-984.
- Van der Waal, M.J.; Racz, L.G. 1989. Mass transfer in corrugated plate membrane modules. I : Hyperfiltration experiments. J. Membr. Sci., 40, 243-260.
- Wijers, M.C.; Pouliot, Y.; Gauthier, S.F. 1998. Use of nanofiltration for the desalting of peptide fractions from whey protein enzymatic hydrolysates. Le Lait, 78, 621-632.
- Zeman, L.; Wales, M. 1981. Steric rejection of polymeric solutes by membrane with uniform pore size distribution. Sep. Sci. Technol., 16, 275-290.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans cette étude, nous avons tenté d'améliorer notre compréhension des mécanismes de fractionnement de mélanges peptidiques par nanofiltration, et ce en vue de produire de grandes quantités de peptides à haute fonctionnalité.

Dans la première partie, nous avons mis au point deux hydrolysats trypsiques à partir de différentes sources (commerciale et expérimentale) de  $\beta$ -lactoglobuline, afin d'étudier l'impact de la composition de la matière première sur celle des hydrolysats obtenus. Les résultats ont montré que le choix de la matière première a peu d'influence sur le profil peptidique des hydrolysats totaux (HT) résultants. Par contre, la teneur en sels, en protéines et en lactose de la  $\beta$ -lg utilisée détermine directement la composition de l'HT ainsi que la proportion des différents peptides. Le procédé de Léonil et al. (1997) utilisé pour purifier la  $\beta$ -lg expérimentale s'est avéré peu intéressant. Il permet certes d'obtenir un très bon degré de pureté de la protéine (95.3%) mais la teneur en sels (citrate) est extrêmement élevée ce qui rend son utilisation en alimentation difficile. De plus, son dessalage s'avère difficile à cause des interactions entre le citrate et les protéines. Du fait de sa forte charge en sels, cet hydrolysat n'a d'ailleurs pu être utilisé dans les essais ultérieurs de nanofiltration, car la force ionique de la solution que l'on obtenait était trop élevée.

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons étudié les mécanismes mis en jeu lors du fractionnement de l'hydrolysat trypsinique de  $\beta$ -lg commerciale dépendamment du pH. Les résultats ont confirmé que le pH avait une influence prédominante sur le flux de perméation et le colmatage ainsi que sur la transmission des peptides, en déterminant non seulement leur charge, mais aussi leur solubilité. La sélectivité de leur fractionnement par nanofiltration dépend donc de leur état physico-chimique (taille, charge, solubilité) qui est lui même déterminé par le pH. La solubilité peut donc être utilisée au même titre que la charge pour produire des fractions spécifiques de peptides par NF, selon qu'ils sont sous forme soluble ou d'agrégats au pH considéré. Par exemple, sachant qu'un peptide est

soluble à un certain pH alors qu'il est sous forme d'agrégat à un autre, on pourrait, en ajustant le pH, faciliter son passage ou au contraire sa rétention. L'effet de charge n'est donc pas l'effet prépondérant du pH. La solubilité des peptides est tout aussi importante, et les deux phénomènes interagissent en fonction du pH pour permettre le passage ou non des peptides à travers la membrane de nanofiltration. Il serait d'ailleurs intéressant, en se plaçant dans des conditions de solubilité limites, de tenter de séparer certains peptides en fonction de leur solubilité.

Enfin, il serait judicieux de mettre au point une méthode analytique d'HPLC permettant d'obtenir des chromatogrammes avec un pic individualisé pour chaque peptide pour ensuite les identifier par spectrométrie de masse. Il serait alors possible de calculer la transmission de chaque peptide selon le pH et donc de mieux comprendre l'ensemble des mécanismes mis en jeu.

## **BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE**

Cette section présente les références de l'introduction générale et de la revue de littérature.

Abubakar, A.; Saito, T.; Kitazawa, H.; Kawai, Y.; Itoh, T. 1998. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci.*, 81 (12), 3131-3138.

Adler-Nissen, J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier App. Sci., New York, U.S.A.

AOAC 1980. Official Methods of Analysis, 13<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Barrantes, L.D.; Morr, C.V. 1997. Partial deacidification and demineralization of cottage cheese whey by nanofiltration. *J. Food Sci.*, 62 (2), 338-341.

Bernal, V.; Jelen, P. 1985. Thermal stability of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 68, 2847-2852.

Bramaud, C.; Aimar, P.; Daufin, G. 1997a. Whey protein fractionation : isoelectric precipitation of  $\alpha$ -lactalbumin under gentle heat treatment. *Biotechnol. and Bioeng.*, 56 (4), 391-397.

Bramaud, C.; Aimar, P.; Daufin, G. 1997b. Optimisation of a whey protein fractionation process based on the selective precipitation of  $\alpha$ -lactalbumine. *Lait*, 77, 411-423.

Brulé, G.; Roger, L.; Fauquant, J.; Piot, M. 1980. Procédé de traitement d'une matière à base de caséine contenant des phosphocaséinates de cations monovalents ou leurs dérivés, produits obtenus et applications. Brevet Fr 2 474 829, INPI, Paris

- Caessen, P.W.J.R.; Gruppen, S.V.H. 1997. Method for the isolation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterisation of the purified product. *Int. Dairy Journal*, 4, 229-235.
- Casal, H.L.; Kohler, U.; Mantsch, H.H. 1988. Structural and conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin B : an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochem. And Biophys. Acta*, 957, 11-20
- Chaufer, B.; Rabiller-Baudry, M.; Guihard, L.; Daufin, G. 1996. Retention of ions in nanofiltration at various ionic strength. *Desalination*, 104, 37-46.
- Chen, G.; Chai, X.; Yue, P.L.; Mi, Y. 1997. Treatment of textile desizing wastewater by pilot scale nanofiltration membrane separation. *J. Membr. Sci.*, 127, 93-99.
- Chen, S.X.; Hardin, C.C.; Swaisgood, H.E. 1993. Purification and characterization of  $\beta$ -structural domains of  $\beta$ -lactoglobulin liberated by limited proteolysis. *J. Prot. Chem.* 12, 613-620.
- Chiba, H.; Yoshikawa, M. 1986. Biologically functional peptides from food proteins : new opioid peptides from milk proteins. *Dans Protein Tailoring for Food and Medical Uses*, (R.E. Feeney et J.R. Whitaker ed.) New York. pp 123-153.
- Cho, Y.; Batt, C.A.; Sawyer, L. 1994. Probing the retinol binding site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal Biol. Chem.*, 269, 102-107.
- Dalgalarondo, M.; Chobert, J.M.; Dufour, E.; Bertrand-Harb, C.; Dumont, J.P.; Haertlé, T. 1990. Characterisation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B tryptic peptides by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft*, 45(40), 212-216.

- Daufin, G.; Kerhervé, F.L.; Aimar, P.; Mollé, D.; Léonil, J.; Nau, F. 1995. Electrofiltration of solutions of amino acids or peptides. *Lait*, 75, 105-115.
- de Wit, J.N.; Hontlez-Backx, E. 1981. Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum : conséquences des traitements thermiques. *La Technologie Laitière*, 952, 19-22.
- de Wit, J.N.; Klarenbeek, G. 1981. A differential scanning calorimetric study of the thermal behavior of bovine  $\beta$ -lactoglobulin at temperature up to 160°C. *J. Dairy Res.*, 48, 293-302.
- de Wit, J.N. 1989. The use of whey protein products. A review. *Nizo Verlag*, 295, 3-20.
- de Witte, J.P. 1996. Surface water potabilisation by means of novel nanofiltration element. *Desalination*, 108, 153-157.
- Donnan, F.G. 1911. Theorie of membrane equilibria and membrane potentials in the presence of non-dialysing electrolytes. A contribution to physical-chemical physiology. Traduction intégrale dans *J. Membr. Sci.*, 100, 45-55.
- Dufour, E.; Bertrand-Harb, C.; Tomasz, H. 1993. Reversible effects of medium dielectric constant on structural transformation of  $\beta$ -lactoglobulin and its retinol binding. *Biopolymers* 33 : 589-598.
- Dybing, S.T.; Smith, D.E. 1991. Relation of chemistry and processing procedures to whey protein functionality : a review. *Cultured Dairy Products Journal*, 4-12.
- Eckner, K.F.; Zottola, E.A. 1992a. Modeling flux of skim milk as function of pH, acidulant, and temperature. *J. Dairy Sci.*, 75, 2952-2958.



- Eckner, K.F.; Zottola, E.A. 1992b. Partitioning of skim milk components as function of pH, acidulant, and temperature. *J. Dairy Sci.*, 75, 2092-2097.
- Eigel, W.N.; Butler, J.E.; Ernstrom, C.A.; Farrel, H.M.; Harwalker, V.R.; Jenness, R.; Whitney, R.Mcl. 1984. Nomenclature of proteins-1. (B.J.F. Hudson ed.) Applied Science Publ. London and New Jersey. pp 1-60.
- Eriksson, B.; Hallberg, M.; Wachenfeldt, J. 1996. Nanofiltration of highly colored raw water for drinking water production. *Desalination*, 108, 129-141.
- Eriksson, P. 1988. Nanofiltration extends in the range of membrane filtration. *Environ. Prog.*, 7 (1), 58-62.
- Ferry, J.D. 1936. Ultrafilter membranes and ultrafiltration. *Chem. Rev.*, 18, 373-455.
- Fox, P.F.; Morissey, P.A.; Mulvihill, D.M. 1982. Chemical and enzymatic modification of food proteins. Dans : Developments in food proteins-1. (B.J.F. Hudson ed.) Applied Science Publ. London and New Jersey. pp 1-60.
- Garem, A.; Daufin, G.; Maubois, J.L.; Chaufer, Léonil J. 1998. Ionic interactions in nanofiltration of  $\beta$ -casein peptides. *Biotechnol. And Bioeng.*, 57 (1), 109-117.
- Garem, A.; Daufin, G.; Maubois, J.L.; Léonil J. 1997. Selective separation of amino acids with a charged inorganic nanofiltration membrane : effect of physicochemical parameters on selectivity. *Biotechnol and Bioeng.*, 54 (4), 291-302.
- Garem, A.; Léonil J.; Daufin, G.; Maubois, J.L. 1996. Nanofiltration d'acides aminés sur membranes organiques : influence des paramètres physico-chimiques et de la pression transmembranaire sur la sélectivité. *Le Lait*, 76, 267-281.

- Garem, A. 1995. **Applications de la nanofiltration au fractionnement des hydrolysats peptidiques.** Thèse ENSA, Rennes. France.
- Gault, P.; Fauquant, J. 1992. **Aptitude à la gélification thermique de la  $\beta$ -lactoglobuline : influence du pH, de l'environnement ionique et de la présence des autres protéines du lactosérum.** *Le Lait* 72 : 491-510.
- Gauthier, S.F.; Paquin, P.; Pouliot, Y.; Turgeon, S. 1993. **Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins.** *J. Dairy Sci.*, 79, 321-328
- Gourley, S.F.; Gauthier, S.F.; Pouliot, Y. 1995. **Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied.** *Lait*, 75, 259-269.
- Gourley, L.; Gauthier, s.F.; pouliot, Y.; Mollé, D.; Léonil, J.; Maubois, J.L. 1998. **Identification of casein peptides interacting with polysulfone ultrafiltration membranes.** *Lait*, 78, 633-646.
- Han, I.S.; Cheryan, M. 1996. **Downstream processing of acetate fermentation broths by nanofiltration.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57/58, 19-29.
- Harris, P.; Yoell, R.W. 1985. **Process preparatio of soluble preparatio and use.** United States Patent, Us 45282203.
- Hirs, C.H.W.; Moore, S.; Stein, W.H. 1956. **Peptides obtained by tryptic hydrolyse of performic acid-oxidized ribonuclease.** *J. Biol. Chem.* , 219, 623-642.
- IDF. 1986, **Provisional Standard 20A.** Int. Dairy Fed., Brussels.

- Jelen, P. 1991. Nanofiltration – A new membrane processing application for demineralization in the dairy industry. *J. Can. Inst. Food Sci. Technol.*, 24 (5), 200-202.
- Jensen, J.A. 1996. New systems from APV to minimize losses and effluent load. *Danish Dairy Food Ind.*, 10, 38.
- Kella, N.K.D.; Kinsella, J. 1988. Enhanced thermodynamic stability of  $\beta$ -lactoglobulin at low pH. A possible mechanism. *J. Biochem.*, 255, 113-118.
- Kelly, J.; Kelly, P. 1995. Nanofiltration of whey : quality, environmental and economic aspects. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 48 (1), 20-25.
- Kimura, S.; Tamano, A. 1986. Separation of amino acids by charged ultrafiltration membranes. *Membranes and membrane processes*. 191-197.
- Kinsella, J.E. 1988. Protein modification : effects on functional properties and digestibility. Dans : *Milk proteins : nutritional clinical functional and technological aspects*. Barth, C.A., Schlimme, E. Eds, Springer-verlag New York, 1988.
- Kinsella, J.E.; Whitehead, D.M.; Brady, J.; Bringe, N.A. 1989. Milk protein : possible relationship of structure and function. Dans : *Developments in Dairy Chemistry, Vol 4*, Elsevier Applied Science, New York, 55.
- Kinekawa, Y.I.; Kitabatake, N. 1996. Purification of  $\beta$ -lactoglobulin from whey protein concentrate by pepsin treatment. *J. Dairy Sci.*, 79, 350-356.
- Kristiansen, K.R.; Otte, J.; Ipsen, R.; Qvist, K.B. 1998. Large-scale preparation of  $\beta$ -lactoglobulin A and B by ultrafiltration and ion-exchange chromatography. *Int. Dairy J.*, 8, 113-118.

- Léonil, J.; Molle, D.; Fauquant, J.; Maubois, J. L.; Pearce, R.J.; Bouhallab, S. 1997. Characterisation by Ionisation Mass Spectrometry of lactosyl  $\beta$ -lactoglobuline conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. *J. Dairy Sci.*, 80, 2270-2281.
- Levenstein, R.; Hasson, D.; Semiat, R. 1996. Utilization of the Donnan effect for improving electrolyte separation with nanofiltration membranes. *J. Membr. Sci.*, 116, 77-85.
- Mailliar, P.; Ribadeau-Dumas, B. 1988. Preparation of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -lactoglobulin-free proteins from whey retentate by NaCl salting out at low pH. *J. Food Sci.*, 53(3), 743-745 et 752.
- Maubois, J.L.; Léonil, J. 1989. Peptides du lait à activité biologique. *Lait* 69 : 245-269.
- Martin-Orue, C.; Bouhallab, S.; Garem, A. 1998. Nanofiltration of amino acid and peptide solutions : mechanisms of separation. *J. Membr. Sci.*, 142, 225-233.
- Maté, J.I.; Krotcha, J.M. 1994.  $\beta$ -lactoglobulin separation from whey protein isolate on a large scale. *J. Food Sci.*, 59 (5), 1111-1114.
- Monaco, H.L.; Zanoti, G.; Spadon, P.; Bolognesi, M.; Sawyer, M.; Eliopoulos, E.E. 1987. Crystal structure of the trigonal form of bovine  $\beta$ -lactoglobuline and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1987 : 695-706.
- Morr, C.V. 1979. Utilization of milk proteins and as starting materials for other foodstuffs. *J. Dairy Res.*, 46 : 369-376.
- Morr, C.V.; Ha, E.Y.W. 1993. Whey protein concentrates and isolates : processing and functional properties. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 33(6), 431-476.

- Mulder, M. 1997. **Basic principles of membrane technology, Second edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.**
- Nau, F.; Kerhervé, F.L.; Léonil, J.; Daufin, G. 1995. **Selective separation of tryptic  $\beta$ -casein peptides through ultrafiltration membranes : influence of ionic interactions. Biotechnol. Bioeng., 46, 246-253.**
- Nielsen, M.A.; Coultier, S.T.; Morr, C.V.; Rosenau, J.R. 1973. **Four factor response surface experimental design for evaluating the role of processing variables upon proteins denaturation in heated whey systems. J. Dairy Sci., 56, 76-83.**
- Palmer, H.A. 1934. **The preparation of crystalline globulin from the albumine fraction of cow's milk. J. Biol. Chem., 104, 359-372.**
- Papiz, M.Z.; Sawyer, L.; Eliopoulos, E.E.; North, A.C.T.; Findlay, J.B.C.; Sivaprasadarao, R.; Jones, T.A.; Newcomer, M.E.; Kraulis, P.J. 1986. **The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. Nature, 324 (27 novembre), 383-385.**
- Pearce, R.J. 1983. **Thermal separation of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin in bovine Cheddar cheese whey. Aust. J. Dairy Technol., 38, 144-149.**
- Pierre, A.; Fauquant, J. 1986. **Principes pour un procédé industriel de fractionnement des protéines du lactosérum. Lait, 66 (4), 405-419.**
- Pouliot, Y.; Wijers, M.C.; Gauthier, S.F.; Nadeau, L. 1999. **Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. J. Membr. Sci., 4095, 1-10.**
- Pouliot, Y.; Gauthier, S.F.; Bard, C. 1993. **Fractionation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration hollow fiber membranes. J. Membr. Sci., 80, 257-264.**

- Rautenbach, R.; Linn, T. 1996. High-pressure osmosis and nanofiltration, a ``zero discharge`` process combination for the treatment of waste water with severe fouling/scaling potential. *Desalination*, 105, 63-70.
- Rautenbach, R.; Vossenkaul, K.; Linn, T.; Katz, T. 1996. Waste water treatment by membrane processes- New development in ultrafiltration and reverse osmosis. *Desalination*, 108, 247-253.
- Rautenbach, R.; Gröschl, A. 1990. Separation potential of nanofiltration membranes. *Desalination*, 77, 73-84.
- Reddy, M.; Kella, N.K.D.; Kinsella, J.E. 1988. Structural and conformational basis of the resistance of  $\beta$ -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 737-741.
- Sanderson, W.B., Brady, A.P., Whitehead, G.F., Oldham, I.J., Brockwell, I.P. 1994. Recycling salt solution in food processing and apparatus thereof. PCT-International-Patent-Application, WO 94-23586 A1, 11 pp.
- Susi, H.; Byler, D.M. 1986. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods for Protein Analysis* 130 : 290-311.
- Sawyer, L.; Brownlow, S.; Polikarpov, I.; Wu, S.Y. 1998.  $\beta$ -lactoglobulin : structural studies, biological clues. *Int. Dairy Journal* 8 : 65-72.
- Swaisgood, H.E. 1982. Chemistry of milk proteins. Dans : *Developments in Dairy Chemistry-1*. (P.F. Fox ed.) Applied Science Publ. New York.
- Tani, F.; Schiota, A.; Chiba, H.; Yoshikawa, M. 1994. Serorphin, an opioid peptide derived from bovine serum albumin. Dans  *$\beta$ -asomorphins and Related Peptides : Recent developments*. V. Brantl,; H. Teschemacher ed. VCH, Weinheim, pp 49-53.

- Timmer, J.M.K.; van der Horst, H.C.; Robbertsen, T.; 1993. Transport of lactic acid through reverse osmosis and nanofiltration membranes. *J. Membr. Sci.*, 85, 205-216.
- Tsuru, T.; Shutou, T.; Nakao, S.I.; Kimura, S. 1994. Peptide and amino acid separation with nanofiltration membranes. *Separation Science and technology*, 29 (8), 971-984.
- Tupasela, T.; Koskela, P.; Pahkala, E.; Kankare, P. 1997. Optimizatio of centrifugal separation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Agricultural and Food Science in Finland*, 6, 193-198.
- Turek, M.; Gonet, M. 1996. Nanofiltration in the utilization of coal-mine brines. *Desalination*, 108, 171-177.
- Turgeon, S.L.; Gauthier S.F. 1990 Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process : production and characterization. *J. food Sci.*, 55(1) : 106-110.,157
- Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F.; Paquin, P. 1991. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. *J.Agric. Food Chem.*, 39 : 673-676.
- Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F.; Mollé, D.; Léonil, J. 1992. Interfacial properties of tryptic peptides of  $\beta$ -lactoglobulin. *J.Agric. Food Chem.*, 40(4), 669-675.
- van der Horst, H.C.; Timmer, J.M.K.; Robbertsen, T.; Leenders, J. 1995. Use of nanofiltration for concentration and demineralization in the dairy industry : model for mass transport. *J. Membr. Sci.*, 104, 205-218.
- Van der Waal, M.J.; Racz, L.G. 1989. Mass transfer in corrugated plate membrane modules. I : Hyperfiltration experiments. *J. Membr. Sci.*, 40, 243-260.

- Wadley, S.; Brouckaert, C.J.; Baddock, L.A.D.; Buckley, C.A. 1995. Modelling of nanofiltration applied to the recovery of the salt from waste brine at a sugar decolourisation plant. *J. Membrane Sci.* 102, 163-175.
- Walsh, C.J.; Thomas, R.L.; Kunkel, M.E. 1989. The use of metallic ultrafiltration membranes to assess calcium availability *in vitro*. *Food Chem.*, 32, 307-317.
- Wijers, M.C.; Pouliot, Y.; Gauthier, S.F. 1998. Use of nanofiltration for the desalting of peptide fractions from whey protein enzymatic hydrolysates. *Lait*, 78, 621-632.
- Xu, R.J. 1998. Bioactive peptides in milk and their biological and health implication. *Food Rev. Int.*, 14(1), 1-16.
- Yamauchi, K. 1992. Biologically functional proteins of milk and peptides derived from milk proteins *International Dairy Federation Bulletin*. 272 : 51-58.