

SOPHIE MYRAND

**AMÉLIORATION DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES  
ET ORGANOLEPTIQUES D'HYDROLYSATS ENZYMATIQUES  
DE PROTÉINES DU LACTOSÉRUM DESTINÉS À LA  
FORTIFICATION PROTÉIQUE D'UN JUS D'ORANGE**

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

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

AOÛT 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.

0-612-47527-1

**Canada**

## RÉSUMÉ

La fortification des jus de fruits en protéines du lactosérum est limitée actuellement par leur instabilité lors du traitement de pasteurisation appliqué à ce type de produit. Afin de résoudre ce problème, cette étude avait pour but de mettre au point un hydrolysate enzymatique de protéines du lactosérum qui soit soluble à forte concentration dans un jus d'orange pasteurisé, et qui contienne une forte proportion de peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da), reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme. L'ingrédient hydrolysé devait présenter une saveur non amère de manière à permettre son addition à forte concentration dans le jus d'orange. Les résultats ont démontré que l'hydrolyse d'un isolat de protéines du lactosérum à l'aide de l'enzyme Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II et d'un mélange Alcalase/Flavourzyme, suivi du fractionnement des mélanges par ultrafiltration, permet d'obtenir des hydrolysats présentant de nombreux avantages nutritionnels pour la fortification protéique de jus de fruits. Ces ingrédients sont riches (>86%) en protéines de bonne qualité (CEP~3.2), pauvres (<1%) en matière grasse et en lactose, ils sont fortement hydrolysés (AN/TN 20-29%) et contiennent une très forte proportion (75-90%) de peptides de petites tailles (<5000 da). Additionnés à un jus d'orange à forte concentration (4% protéines), ces ingrédients demeurent solubles à plus de 98% suite au traitement de pasteurisation des jus. De plus, leur ajout au jus d'orange n'influence pas de façon importante l'apparence ou la viscosité du jus. Enfin, l'hydrolysate préparé à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II confère au jus d'orange une saveur plutôt neutre, alors qu'une note d'amertume peu prononcée est perceptible dans le cas de l'hydrolysate obtenu avec le mélange Alcalase/Flavourzyme.

## AVANT-PROPOS

Ce projet de maîtrise m'a permis de vivre une des parties les plus intéressantes et stimulantes de ma vie. Je tiens à en remercier ma directrice de recherche, Mme Sylvie Gauthier, pour son esprit critique et ses judicieux conseils qui ont contribué à la réussite de ce travail.

Je remercie le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), d'une part pour m'avoir soutenue financièrement au cours de mes études graduées et d'autre part pour avoir rendu possible le financement de ces travaux de recherche dans le cadre d'une action concertée avec comme partenaires financiers Novalait inc. et le Centre Québécois de Valorisation de la Biomasse (CQVB).

J'aimerais également remercier mes parents sans qui je n'aurais pu faire de longues études et qui, surtout, m'ont donné le goût d'apprendre. Merci pour votre soutien et vos encouragements qui m'ont permis d'aller au bout de mes ambitions. Je vous en serai toujours reconnaissante.

Enfin, je ne peux terminer sans remercier de nombreux amis pour leur présence, leurs conseils et tous les plaisirs que nous avons partagés ensemble. À vous tous, merci d'avoir été là. Un merci spécial à ma grande amie Guénolée avec qui j'ai développé de merveilleux liens d'amitié et sans qui cette aventure, que sont les études graduées, n'aurait été aussi passionnante et enrichissante.

## TABLE DES MATIÈRES

	page
<b>RÉSUMÉ</b> .....	II
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	III
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	IV
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	VII
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	XI
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	4
1. LES ALIMENTS FONCTIONNELS ET LES NUTRACEUTIQUES .....	5
1.1 Définitions, réglementations, marchés .....	5
1.2 Les boissons fortifiées en protéines du lactosérum .....	9
2. LES PROTÉINES DU LACTOSÉRUM .....	14
2.1 Le lactosérum et ses dérivés .....	14
2.2 Les principales protéines du lactosérum .....	16
2.2.1 La $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) .....	16
2.2.2 L' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -la) .....	22
2.3 La stabilité thermique des protéines du lactosérum .....	22
2.4 Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum .....	24
2.5 La qualité nutritionnelle des protéines du lactosérum .....	26

3.	HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PROTÉINES DU LACTOSÉRUM.....	30
3.1	Hydrolyse enzymatique des protéines .....	30
3.2	Caractérisation des hydrolysats enzymatiques de protéines .....	34
3.3	Effet de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum.....	36
3.4	Effet de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés nutritionnelles des protéines du lactosérum.....	38
3.5	L'amertume des hydrolysats enzymatiques de protéines .....	39
3.6	Les méthodes de désamérisation des hydrolysats enzymatiques de protéines .....	44
4.	BUT, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....	48

**CHAPITRE II : AMÉLIORATION DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES  
ET ORGANOLEPTIQUES D'HYDROLYSATS ENZYMATIQUES DE  
PROTÉINES DU LACTOSÉRUM DESTINÉS À LA FORTIFICATION  
PROTÉIQUE D'UN JUS D'ORANGE .....**

1.	RÉSUMÉ .....	52
2.	INTRODUCTION.....	53
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	56
3.1	Matériel .....	56
3.2	Dosage de l'activité enzymatique spécifique des enzymes .....	56
3.3	Mise au point des conditions d'hydrolyse enzymatique de l'isolat de protéines du lactosérum.....	57
3.4	Préparation finale des hydrolysats enzymatiques.....	59
3.5	Caractérisation de l'isolat de protéines du lactosérum et des hydrolysats protéiques.....	60

3.6 Caractérisation des jus d'orange additionnés de l'isolat de protéines du lactosérum  
et des hydrolysats protéiques ..... 64

3.7 Évaluation sensorielle de l'amertume ..... 66

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION ..... 67

**CONCLUSION GÉNÉRALE**..... 92

**BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE**..... 96

## LISTE DES TABLEAUX

page

## CHAPITRE I

<b>Tableau 1</b>	Allégations santé actuellement permises aux États-Unis. ....	7
<b>Tableau 2</b>	Exemples de boissons nutraceutiques disponibles sur le marché.....	10
<b>Tableau 3</b>	Exemples de boissons à base de lactosérum disponibles sur le marché .....	12
<b>Tableau 4</b>	Composition chimique et pH du lactosérum acide et du lactosérum doux.....	15
<b>Tableau 5</b>	Comparaison de la composition d'une poudre de lactosérum, de concentrés de protéines du lactosérum (CPL) et d'un isolat de protéines du lactosérum (IPL) .....	17
<b>Tableau 6</b>	Composition en acides aminés essentiels de la protéine de référence proposée par la FAO/WHO/UNU (1985) et de quelques protéines alimentaires .....	27
<b>Tableau 7</b>	Comparaison de la valeur nutritive de quelques protéines alimentaires à partir de différents indices: indice chimique (IC), coefficient d'efficacité protéique (CEP), «protein digestibility corrected amino acid score» (PDCAAS) et valeur biologique (VB).....	29



<b>Tableau 8</b>	Énergies libres de transfert (hydrophobicité) des chaînes carbonées des acides aminés présents dans les protéines alimentaires .....	41
<b>Tableau 9</b>	Comparaison des niveaux d'hydrophobicité (%) de certaines protéines alimentaires et de l'amertume de leurs hydrolysats enzymatiques .....	43
<b>Tableau 10</b>	Travaux de la littérature portant sur la désamérisation d'hydrolysats protéiques à l'aide d'exopeptidases.....	47

## CHAPITRE II

<b>Tableau 1</b>	Effet des conditions (T°/durée) du traitement thermique de désactivation des enzymes Alcalase et Flavourzyme sur le ratio AN/TN (%), mesuré après une hydrolyse de 30 minutes (T30) et une durée d'hydrolyse additionnelle de 60 minutes (T30 + 60).....	72
<b>Tableau 2</b>	Composition chimique, ratio AN/TN et profils de poids moléculaires des composantes protéiques de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro <sup>®</sup> ) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco <sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF).....	76

- Tableau 3** Indice de solubilité de l'azote (NSI, %) mesuré dans l'eau, dans la solution modèle et dans le jus d'orange additionnés de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF) ..... 79
- Tableau 4** Turbidité (transmittance à 610 nm) de la solution modèle additionnée selon quatre cotes protéiques (CP) de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF)..... 82
- Tableau 5** Viscosité (cp  $\pm$  1 cp) de la solution modèle et du jus d'orange additionnés selon quatre cotes protéiques (CP) de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF)..... 83

- Tableau 6** Indice de solubilité de l'azote (NSI, %) mesuré après le traitement thermique (100°C/7 min) de la solution modèle et du jus d'orange additionnés selon quatre cotes protéiques (CP) de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF) ..... 85
- Tableau 7** Indice de solubilité de l'azote (NSI, %) mesuré après la pasteurisation (86 ± 2°C/17 sec) de jus d'orange additionnés selon une cote protéique de 20 des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF)..... 88

## LISTE DES FIGURES

page

## CHAPITRE I

- Figure 1** Représentation schématique de la structure tertiaire de la  $\beta$ -lactoglobuline, montrant la liaison d'une molécule de rétinol..... 19
- Figure 2** Représentation schématique des changements de structure quaternaire de la  $\beta$ -lactoglobuline en fonction du pH. Monomère (A); Dimère (B); Octamère (C)..... 20
- Figure 3** Représentation schématique du procédé de fabrication industrielle d'un hydrolysate enzymatique de protéines..... 33

## CHAPITRE II

- Figure 1** Comparaison des cinétiques d'hydrolyse de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) obtenues à l'aide de l'Alcalase, combinée à la Chymotrypsine, à la Debitrase DBP20 ou à la Flavourzyme. Les symboles noirs indiquent l'apparition d'un début de gélification dans le mélange réactionnel. Les cinétiques d'hydrolyse ont été suivies par la méthode pH-stat jusqu'à un degré d'hydrolyse de 4%, puis par osmométrie jusqu'à la fin de l'hydrolyse ..... 70

- Figure 2** Cinétiques d'hydrolyse de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) obtenues à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF). Les cinétiques d'hydrolyse ont été suivies par la méthode pH-stat jusqu'à un degré d'hydrolyse de 4%, puis par osmométrie jusqu'à la fin de l'hydrolyse où les réactions ont été stoppées par ultrafiltration ..... 74
- Figure 3** Apparence des jus d'orange fortifiés en protéines suite à l'application du traitement de pasteurisation (86°C/17 sec). Les jus ont été additionnés (cote protéique de 20) de Bipro<sup>®</sup> et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF). Le témoin est un jus d'orange nature ..... 90

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les aliments fonctionnels et les nutraceutiques sont une nouvelle gamme de produits se définissant comme des aliments ou des ingrédients qui possèdent non seulement de bonnes propriétés nutritionnelles, mais qui offrent également des effets bénéfiques pour la santé des individus (Stephen, 1998). En raison de leur image positive, ces produits suscitent un intérêt croissant chez les consommateurs (Paquin et Gauthier, 1995; Ohr, 1997; Hilliam, 1998) et d'ici l'an 2010, on prévoit que le marché des aliments fonctionnels et des produits nutraceutiques pourrait atteindre 500 milliards de dollars US (Paquin et Gauthier, 1995).

Dans le domaine des aliments fonctionnels et des produits nutraceutiques, le secteur des boissons non alcoolisées est le plus actif. Dans ces boissons, de nombreuses composantes nutritives peuvent être ajoutées telles que des vitamines (A, B, C et E), des minéraux (calcium, magnésium, fer, etc.), des polysaccharides (fibres) et des protéines. Parmi ces boissons, celles fortifiées en protéines visent un objectif nutritionnel et sont destinées à une clientèle dont les besoins en protéines sont élevés comme les sportifs, les personnes âgées ou les individus sous régime amaigrissant (Frøkjær, 1994; Burn, 1995; Swartz, 1995; Platzman, 1998). Pour l'industrie laitière, la fortification protéique des boissons représente donc une voie de valorisation intéressante pour le lactosérum de fromagerie.

En effet, les protéines du lactosérum sont largement utilisées pour la fortification protéique des aliments en raison de leur excellente valeur nutritive et de leurs bonnes propriétés fonctionnelles. De façon générale, ces protéines sont solubles sur une gamme étendue de pH (Mangino, 1992; Morr et Ha, 1993), elles donnent des solutions peu visqueuses et offrent d'excellentes propriétés gélifiantes. Dans le cas de leurs propriétés moussantes et émulsifiantes, elles sont variables selon les ingrédients protéiques et les traitements qu'ils ont subis (de Wit, 1989a; Kinsella et al., 1989; Mangino, 1992). Un des problèmes majeurs de ces protéines est toutefois leur manque de stabilité lors des traitements thermiques. En effet, lors d'un chauffage (15 à 30 min.) à 70-85°C en milieu acide (pH 4.5) la  $\beta$ -

lactoglobuline, principale protéine du lactosérum, se présente sous forme dénaturée et insoluble ce qui conduit à l'agrégation des protéines (de Wit et Klarenbeek, 1981; Pearce, 1989). L'addition des protéines du lactosérum à des produits acides pasteurisés est donc limitée par leur instabilité thermique.

Afin d'améliorer leur stabilité thermique et certaines de leurs propriétés fonctionnelles, des traitements de modification des protéines du lactosérum ont été proposés. Ainsi, plusieurs travaux ont démontré que l'hydrolyse enzymatique, réalisée dans des conditions contrôlées, permettait d'améliorer leur solubilité (Schmidt et Poll, 1991; Turgeon et al., 1992; Slattery et Fitzgerald, 1998; Wu et al., 1998), leurs propriétés émulsifiantes et moussantes (Turgeon et al., 1995; Lieske et Konrad, 1996; Singh et Dalgleish, 1998; Wu et al., 1998), de même que leur stabilité à la chaleur (Haque, 1993; Frøkjær, 1994; Mahmoud, 1994). De plus, ce type de traitement permet d'obtenir des profils d'acides aminés et de peptides bien définis, lesquels sont reconnus pour conduire à une meilleure assimilation par l'organisme (Ziegler et al., 1990; Adachi et al., 1991; Motion, 1992; Grasset et Bovetto, 1993), tout en réduisant les risques d'allergies souvent associés à ces protéines, en particulier à la  $\beta$ -lactoglobuline (Jost et al., 1987; Schmidt et Poll, 1991; Nakamura et al., 1993b; Ena et al., 1995).

Bien que l'hydrolyse enzymatique présente de nombreux avantages, elle mène souvent à la formation d'amertume dans les hydrolysats protéiques, laquelle est liée à la présence d'acides aminés hydrophobes dans les peptides libérés lors de la réaction d'hydrolyse (Matoba et Hata, 1972; Adler-Nissen, 1976; Yeom et al., 1994). L'incorporation de ces hydrolysats dans des produits alimentaires peut donc conduire à des défauts de saveur (Ma et al., 1983; Adler-Nissen, 1986a; Pedersen, 1994; Godfrey, 1996), en particulier dans les boissons fortifiées en protéines hydrolysées. Par contre, de nombreux travaux ont démontré que l'amertume des hydrolysats protéiques peut être réduite par l'utilisation d'exopeptidases spécifiques à l'hydrolyse des acides aminés hydrophobes en position terminale des peptides amers (Umetsu et al., 1983; Minagawa et al., 1989; Nakamura et al., 1993a; Gobberti et al., 1995; Ge et Zhang, 1996; Izawa et al., 1997a; 1997b; McDonnell et al., 1997).

Dans cette optique, la présente étude visait donc la mise au point d'un hydrolysate enzymatique de protéines du lactosérum destiné à la fortification protéique d'un jus de fruits qui soit facilement assimilable par l'organisme (peptides <5000 da), qui résiste au traitement de pasteurisation du jus et qui offre des qualités organoleptiques acceptables et ce, en vue de la préparation d'une boisson «nutraceutique».

La prochaine section du mémoire (chapitre I) est une revue de la littérature qui présente brièvement le domaine des aliments fonctionnels et des nutraceutiques et qui résume les principales caractéristiques physico-chimiques, fonctionnelles et nutritionnelles des protéines du lactosérum. Par la suite, quelques notions fondamentales sur l'hydrolyse enzymatique des protéines et son impact sur les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines du lactosérum sont revues, suivi d'une section consacrée à l'amertume des hydrolysats enzymatiques de protéines et aux différentes méthodes de désamérisation de ces produits. Finalement, une section est consacrée à la présentation du but, des hypothèses et des objectifs à la base de ce travail. À noter que les références citées dans le mémoire sont répertoriées dans la section «Bibliographie générale», trouvée à la toute fin du document.



## **CHAPITRE I**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1. LES ALIMENTS FONCTIONNELS ET LES NUTRACEUTIQUES

### 1.1 Définitions, réglementations, marchés

Le terme «aliment fonctionnel» a été introduit au Japon au milieu des années 80. Depuis, plusieurs termes ont été utilisés pour désigner ces aliments ayant un effet bénéfique sur la santé. Les termes «nutraceutique», «designer food», «nutritional food», «medical food» et «pharmafood» en sont des exemples. En Amérique du Nord, les termes nutraceutiques et aliments fonctionnels ont souvent été utilisés sans distinction. En raison de problèmes législatifs, un groupe de scientifiques de Santé Canada a toutefois suggéré que ces termes soient utilisés de façon indépendante et selon les définitions suivantes (Stephen, 1998):

Un *aliment fonctionnel* s'apparente à un aliment conventionnel, est consommé dans le cadre d'une diète normale et démontre des effets physiologiques bénéfiques et/ou permet de réduire les risques de certaines maladies et ce, au delà de ses fonctions nutritionnelles.

Un *nutraceutique* est un produit dérivé d'un aliment, mais vendu sous la forme de comprimés, de poudre ou tout autre forme médicale, et qui démontre des effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme, incluant la prévention et le traitement de certaines maladies.

La législation sur les aliments fonctionnels et les produits nutraceutiques est très complexe. Elle est aussi fort différente d'un pays à l'autre et représente la barrière la plus importante à l'introduction de ces produits sur le marché (Paquin et Gauthier, 1995). Le Japon est actuellement le seul pays à avoir mis sur pied un système de contrôle et d'approbation spécifique aux aliments fonctionnels et à leurs allégations santé. Nommé FOSHU (*Foods for Specified Health Use*), ce programme gouvernemental est entré en vigueur en 1991 et jusqu'à présent, la mise en marché d'une centaine de ces aliments fonctionnels a été approuvée (Burke, 1997; Berner et O'Donnell, 1998; Hasler, 1998; Kubomura, 1998; Stephen, 1998). Au Japon, il est donc possible de commercialiser ce type de produits et de spécifier leurs

effets bénéfiques sur la santé. Toutefois, les produits nutraceutiques sont encore classés dans la catégorie des médicaments et drogues (Stephen, 1998).

En Europe, il n'existe aucune définition légale pour les aliments fonctionnels et bien que les industries laitières aient été très actives dans la commercialisation de produits pouvant être considérés comme des aliments fonctionnels (ex.: yogourt au bifidus), la réglementation ne permet pas l'affichage d'allégations santé (Hilliam, 1998; Stephen, 1998). Cependant, la mise en marché de produits spécialisés qui se différencient des produits alimentaires destinés à la consommation de masse est permise (Hilliam, 1998). Par exemple, le produit *Isalt* est un sel de table riche en magnésium, utilisé pour sa capacité à réduire la tension artérielle.

Aux États-Unis, la catégorie des «aliments fonctionnels» n'est pas encore reconnue légalement (Hasler, 1998) et il n'existe aucune réglementation spécifique concernant les aliments fortifiés (Berner et O'Donnell, 1998; Stephen, 1998). Toutefois, l'attitude des organismes de réglementation à l'égard de ces produits est plus positive qu'au Canada, surtout depuis l'entrée en vigueur du *Nutrition Labeling and Education Act* (NLEA) en 1990 et du *Dietary Supplement Act* en 1994. En effet, la FDA (*Food and Drug Administration*) a approuvé dix allégations santé pour les ingrédients suivants: le calcium, le sodium, les lipides, les fibres, le xylitol et le folate. Ces allégations santé sont présentées au Tableau 1.

Contrairement à ce qui existe aux États-Unis et au Japon, la législation canadienne est plus stricte et ne fait pas de discrimination entre les aliments dits conventionnels et toute forme de suppléments alimentaires, incluant les nutraceutiques (Stephen, 1998). Au Canada, les produits ingérés sont considérés soit comme des aliments, soit comme des médicaments. Au sens de la loi, il n'existe pas actuellement de catégorie intermédiaire. Par conséquent, toute allégation concernant les effets préventifs ou thérapeutiques d'un produit le classe automatiquement dans la catégorie des médicaments et drogues. Les effets bénéfiques sur la santé ne peuvent donc pas être inscrits sur l'étiquette d'un produit alimentaire. Pour un

**Tableau 1:** Allégations santé actuellement permises aux États-Unis<sup>1</sup>.

- 
1. Le calcium et son rôle dans la prévention de l'ostéoporose
  2. Le sodium et son effet sur l'hypertension artérielle
  3. Les aliments à teneur réduite en lipides et leurs effets bénéfiques contre certains cancers
  4. Les aliments à teneur réduite en lipides, en acides gras saturés et en cholestérol et leurs effets préventifs contre les maladies cardiaques
  5. Les fibres alimentaires et leurs effets préventifs contre certains cancers
  6. Les fibres alimentaires solubles et leurs effets préventifs contre les maladies cardiaques
  7. Le son d'avoine et le psyllium et leurs effets préventifs contre les maladies cardiaques
  8. Les fruits et les légumes et leurs effets préventifs contre certains cancers
  9. Le xylitol et son rôle dans la prévention des caries dentaires
  10. Le folate et son rôle dans la prévention des défauts du tube neural chez les nouveaux-nés
- 

<sup>1</sup> Adapté de Berner et O'Donnell (1998).

tel produit, le fabricant doit donc fournir un numéro DIN (*Drug Identification Number*) ou un GPN (*General Public Number*) et comme dans le cas d'une nouvelle drogue, il doit fournir à Santé Canada les renseignements nécessaires à son évaluation: composition chimique du produit, méthode de production, spécifications pharmacologiques, toxicologiques, microbiologiques et résultats d'études cliniques.

En raison de l'intérêt croissant des consommateurs et des fabricants envers les aliments fonctionnels et les nutraceutiques, Santé Canada a récemment présenté un projet de réglementation qui modifierait éventuellement la Loi sur les aliments et drogues. Ce document prévoit que les aliments fonctionnels ne seront plus soumis aux études cliniques destinées aux médicaments, mais plutôt à un système d'évaluation similaire au modèle japonais. Selon Stephen (1998), la réglementation canadienne sur les aliments fonctionnels et les nutraceutiques devait être modifiée avant la fin de l'année 1998, mais ces changements n'ont toujours pas été effectués.

Étant donné l'absence de consensus dans la définition des aliments fonctionnels et des nutraceutiques, ce marché est difficile à cerner mais quelques données sont disponibles (Hasler, 1998; O'Donnell, 1998). Selon Hilliam (1998), le marché mondial des aliments fonctionnels et des nutraceutiques a atteint 6,6 milliards de dollars US en 1994, avec près de la moitié des ventes réalisées au Japon. Certaines prévisions suggèrent que ce marché pourrait atteindre 17 milliards de dollars US en l'an 2000, avec une croissance plus rapide aux États-Unis qu'en Europe et ce, grâce à une législation plus favorable (Young, 1996). D'autres, telle la firme américaine *Decision Resources Inc.*, estime que le marché international des nutraceutiques et des aliments fonctionnels a atteint 29 milliards de dollars US en 1998 (Hasler, 1998), dont 16,7 milliards aux États-Unis (O'Donnell, 1998). Au début du XXI<sup>e</sup> siècle, les aliments fonctionnels et les nutraceutiques devraient créer un marché annuel de 30 milliards aux États-Unis seulement (*Decision Resources Inc.*). D'après Paquin et Gauthier (1995), un marché international de 500 milliards de dollars US peut être envisagé pour l'an 2010. Il s'agit donc pour l'ensemble des analystes d'un marché en pleine progression.

Le secteur des boissons non alcoolisées est l'un des plus actifs dans le domaine des aliments fonctionnels. Au Japon, plus de la moitié (52 p. cent) des aliments fonctionnels se présentent sous cette forme (Paquin et Gauthier, 1995). Aux États-Unis, 819 millions de dollars ont été dépensés en 1996 pour des boissons, soit près de la moitié (48 p. cent) des ventes en aliments fortifiés (Ohr, 1998). Sur le marché européen, les boissons énergisantes et les boissons pour sportifs ont représenté en 1996 une consommation de près de 536 millions de litres, soit une progression de 27 p. cent par rapport à la consommation enregistrée en 1993 (Hervé, 1997).

La gamme des boissons nutraceutiques offertes sur le marché est très diversifiée. À titre d'exemples, le Tableau 2 présente une liste de boissons nutraceutiques actuellement disponibles. On y retrouve des boissons fortifiées en vitamines (A, B, C et E), en minéraux (calcium, magnésium, fer, etc.), en polysaccharides (fibres) et en protéines. La consommation de ces boissons enrichies assure donc un apport supplémentaire en nutriments essentiels, en remplacement des comprimés vitaminés ou des complexes de minéraux qui sont moins populaires auprès des consommateurs. De plus, des études ont démontré que l'absorption de certains nutriments est souvent facilitée dans le cas des aliments fortifiés, comparativement à celle des suppléments (Paquin et Gauthier, 1995).

## **1.2 Les boissons fortifiées en protéines du lactosérum**

Selon Burn (1995), la demande en aliments fonctionnels est dominée par trois groupes de consommateurs: les personnes âgées, les individus sous régime amaigrissant et les sportifs. En effet, selon Platzman (1998) les fonctions du corps humain liées à la digestion, à l'absorption et à l'assimilation des nutriments perdent de leur efficacité avec le vieillissement. D'après Burn (1995), une personne de 65-70 ans nécessite une diète moins riche en calories, mais non moins protéinée. Dans le cas des personnes sous régime amaigrissant, les diètes à base de protéines permettent une perte de poids corporel tout en maintenant l'équilibre azoté du corps humain (Frøkjær, 1994; Burn, 1995).

**Tableau 2:** Exemples de boissons nutraceutiques disponibles sur le marché<sup>1</sup>.

<b>Produit</b>	<b>Compagnie/Pays</b>	<b>Caractéristique</b>
Fibi	Coca-Cola	Boisson gazeuse riche en fibres bénéfiques pour la santé du système digestif
FibeMini	Otsuka Pharmaceuticals	Boisson gazeuse fortifiée en fibres, vitamines et minéraux
Toshu Cha	Hitachi Zonen Corp.	Thé fortifié en calcium
FP21	Asasi Beer Co.	Boisson pour sportifs à base de protéines, contenant du collagène
Isostar	Wander	Boisson isotonique à base de polysaccharides et de minéraux (Na, K, Mg, Ca, Cl et P)
Pocari Sweet Stevia	Ootsuka	Boisson isotonique à base de stevioside, un glycoside végétal
Red Bull	France	Boisson énergisante à base de caféine, de taurine et d'acides aminés
Sportit	Rawlands	Boisson énergisante à base de sucre et de maltodextrine
Gong	New Drinks Co.	Boisson énergisante contenant de la caféine

<sup>1</sup> Adapté de Potter (1990); Sienkiewicz et Riedel (1990); Jelen (1992); Paquin et Gauthier (1995).

D'autre part, les protéines étant en partie responsables du développement et de la puissance des muscles (Swartz, 1995), les sportifs pratiquant des épreuves d'endurance (ex.: marathon) requièrent une diète riche en protéines. Dans le domaine des boissons pour sportifs, le secteur des boissons isotoniques domine actuellement le marché. Ces boissons, à base d'oligosaccharides, permettraient de maintenir l'équilibre des fluides et des minéraux de l'organisme durant un exercice physique (Hervé, 1997; Burg, 1998). Toutefois, des études récentes ont permis de démontrer que les boissons à base de protéines et d'oligosaccharides, destinées à des athlètes de haut niveau, assuraient un meilleur taux de glycogénéation tout en améliorant le développement de la masse musculaire (Frøkjær, 1994; Burn, 1995).

Dans le domaine des boissons fortifiées en protéines, le lactosérum est largement utilisé. De façon générale, l'addition du lactosérum à ces boissons vise un objectif nutritionnel en raison de la qualité nutritive de ces protéines et de sa richesse en certains minéraux et vitamines (Evans, 1982; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992; Giese, 1995). À titre d'exemple, le Tableau 3 présente une gamme de boissons à base de lactosérum actuellement disponible sur le marché. Dans ces boissons, le lactosérum est additionné sous différentes formes selon les traitements appliqués au produit: lactosérum brute, déminéralisé, déprotéiné, concentrés de protéines ou ingrédients hydrolysés (Tuohy et al., 1988; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992; Swartz, 1995). Jusqu'à présent, l'utilisation d'ingrédients hydrolysés a cependant été réservée aux boissons nutritionnelles du type formules entérales, ou encore à des formules hypoallergéniques destinées aux nourrissons (Jelen, 1992).

Bien que la façon la plus économique d'utiliser le lactosérum dans les boissons soit sous sa forme brute, les concentrés de protéines du lactosérum obtenus par ultrafiltration, de même que la fraction résiduelle générée par ce procédé (perméat) sont souvent utilisés pour la préparation de boissons fortifiées en protéines (Jelen et al., 1987; de Wit, 1989b, Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992). Par exemple, le perméat d'ultrafiltration peut être utilisé pour la préparation de boissons alcoolisées traditionnelles comme la bière. Dans le cas des concentrés (30-70%), ils sont habituellement utilisés pour augmenter la valeur



**Tableau 3:** Exemples de boissons à base de lactosérum disponibles sur le marché<sup>1</sup>.

<b>Produit</b>	<b>Pays</b>	<b>Caractéristiques</b>
Nature's Wonder	Suède	Boisson aux fruits à base de protéines du lactosérum, de lactose hydrolysé et de jus de fruits de la passion, d'ananas, et d'orange (50%)
Clona Dew	Irlande	Boisson à base de jus de fruits et de lactosérum brut
Rivella Active	Suisse	Boisson gazeuse pour sportif à base de jus de fruit, de lactosérum déprotéiné et d'eau
Frusighurt	Allemagne	Boisson aux fruits à base de lactosérum brut et de jus de pomme et citron (10%)
Morea	France	Boisson aux fruits à base de lactosérum concentré et de jus de mangue, goyave, kiwi et fruit de la passion (40%)
Yor	Pays-Bas	Boisson à base de yogourt écrémé (46%), de lactosérum brut (43%) et de jus de fraise, pomme et cerise
Taksi	Pays-Bas	Boisson aux fruits à base de lactosérum brut (85%), de jus de fruits tropicaux (6%) et de saveurs
Latella	Autriche	Boisson aux fruits à base de lactosérum brut et de jus de mangue, pamplemousse et lime
Fauna-fitt	Hongrie	Boisson à base de perméat de lactosérum fermenté (85%) et d'un mélange de jus de fruits (mangue, ananas, fraise)
Interlac	Belgique	Boisson au yogourt à base de lactosérum brut (45%), de yogourt écrémé (44%) et de jus de fraises (4%)

<sup>1</sup> Adapté de Jelen (1992).

nutritive des boissons. De façon à rehausser l'image des boissons gazeuses, de Wit (1989b) et Jelen (1992) ont même suggéré l'ajout des protéines du lactosérum dans ces boissons à calories vides. Selon de Wit (1989b), une boisson peut facilement être fortifiée à plus de 1% de protéines du lactosérum. Toutefois, à des concentrations en protéines supérieures à 3%, la saveur originale de la boisson est affaiblie, probablement en raison de la capacité des protéines à lier certains composés aromatiques (de Wit, 1989b; Fares et al., 1998; Korhonen et al., 1998; Lubbers et al., 1998).

La grande solubilité des protéines du lactosérum sous conditions acides facilite leur utilisation dans les boissons et permet de les utiliser à des valeurs de pH aussi faibles que celles prévalant dans les jus de fruits (Evans, 1982; Mangino, 1992; Frøkjær, 1994; Huffman, 1996; Burrington, 1998a; 1998b). En fait, les ingrédients protéiques retrouvés dans ce type de boissons aux fruits doivent demeurer solubles et offrir une bonne stabilité lors des traitements thermiques appliqués à ce type de produits et ce, même en présence d'acides organiques, de saveurs ou de sucres (Sienkiewicz et Riedel, 1990). À pH acide (<3.8), les protéines du lactosérum seraient résistantes à la coagulation lors du traitement de pasteurisation des boissons (Tuohy et al., 1988; Jelen, 1992). Toutefois, des interactions avec les polysaccharides (ex.: pectine) présents dans les jus de fruits peuvent conduire à la formation d'un réseau gélifié ou encore, augmenter la précipitation des protéines dans le produit (Jelen et al., 1987; de Wit, 1989b; Jelen, 1992). Il est donc important d'accroître la résistance de ces protéines à la chaleur lorsqu'elles sont destinées à la fortification protéique des jus de fruits. Selon Mangino (1992), la solubilité et la stabilité des protéines lors des traitements thermiques sont directement reliées à la concentration en lactose des concentrés de protéines du lactosérum. Le lactose aurait pour effet d'augmenter la résistance des protéines à la chaleur et par conséquent, d'améliorer leur solubilité (Evans, 1982; Jelen, 1992; Mangino, 1992; Creamer et MacGibbon, 1996). D'autre part, l'hydrolyse enzymatique des protéines est reconnue par de nombreux auteurs comme un moyen efficace pour améliorer la stabilité à la chaleur des protéines (Haque, 1993; Frøkjær, 1994; Mahmoud, 1994). Cette modification des protéines permettrait d'augmenter, entre autres, la solubilité des protéines dans des solutions hyperprotidiques.

Ces dernières années, la nouvelle vague des aliments fonctionnels relance l'intérêt des boissons à base de protéines du lactosérum en raison de la valeur nutritive de ces protéines. L'excellente compatibilité entre le lactosérum acide et les jus à base d'agrumes, principalement l'orange et le pamplemousse, peut donc être mise à profit pour la préparation de jus enrichis en protéines (Tuohy et al., 1988; Gandhi, 1989; Jelen, 1992). Dans ces jus le lactosérum est facile à mélanger et sa saveur de «petit lait» est bien masquée. Cependant des problèmes technologiques sont à prévoir avec les protéines du lactosérum, comme leur insolubilité suivant la pasteurisation des jus, la saveur salée caractéristique du lactosérum et l'apparition d'amertume si des hydrolysats enzymatiques sont utilisés comme source de protéines.

## **2. LES PROTÉINES DU LACTOSÉRUM**

### **2.1 Le lactosérum et ses dérivés**

Le lactosérum, sous produit de la fabrication fromagère, est obtenu suite à la coagulation des caséines sous l'action de la présure (lactosérum doux), ou suivant l'acidification (lactosérum acide) du lait (Morr, 1989). Il se compose essentiellement d'eau et de lactose, et d'une faible proportion de protéines et de lipides résiduels, comme le montre le Tableau 4. En fait, la teneur en eau du lactosérum est supérieure à 93%, alors que son contenu en protéines est inférieur à 1%; les protéines représentent donc 10 à 12% des solides totaux du lactosérum (Morr, 1989).

En raison des bonnes qualités nutritionnelles et fonctionnelles des protéines du lactosérum, elles sont valorisées et commercialisées sous la forme de concentrés (CPL) ou d'isolats de protéines du lactosérum (IPL). Les technologies et procédés utilisés pour la fabrication de ces ingrédients protéiques ont été revus par de nombreux auteurs (Evans, 1982; Morr, 1989; Jelen, 1992; Morr et Ha, 1993; Mulvihill, 1994; Huffman, 1996). Dans le cas des CPL, ils sont obtenus par un procédé d'ultrafiltration combiné à une ou plusieurs étapes de diafiltration. Ce procédé permet de concentrer les protéines à des teneurs variant

**Tableau 4:** Composition chimique et pH du lactosérum acide et du lactosérum doux<sup>1</sup>.

<b>Constituants (%)</b>	<b>Lactosérum acide</b>	<b>Lactosérum doux</b>
Eau	93,6	93,4
Lactose	4,3	4,9
Protéines	0,7	0,8
Lipides	0,1	0,2
Minéraux	0,8	0,5
Calcium	0.1	0.1
Sodium	0.1	0.1
Potassium	0.2	0.1
Phosphore	0.1	0.1
Acide lactique	0,5	0,2
pH	≤ 5,1	≥ 5,6

<sup>1</sup> Tiré de Bassette et Acosta (1988); Morr (1989).

entre 35 et 80% tout en éliminant une partie du lactose et des minéraux présents dans le lactosérum, comme le montre le Tableau 5. Par contre, les lipides sont concentrés avec les protéines ce qui peut affecter la fonctionnalité des CPL à forte teneur en protéines. Cet effet n'est pas observé dans le cas des IPL, ces derniers étant obtenus par adsorption des protéines sur des résines d'échanges ioniques, suivi d'une étape d'ultrafiltration. Pour ce type de produit, il est donc possible d'atteindre des teneurs en protéines supérieures à 95% avec une élimination quasi-totale du lactose et des lipides, combinée à une diminution importante de la teneur en minéraux. Les IPL, de par leur composition, sont donc bien adaptés à des applications nutritionnelles.

## 2.2 Les principales protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum se définissent comme les protéines du lait qui demeurent solubles suite à la précipitation des caséines à pH acide (à pH 4,6), ou par l'action de la présure (de Wit, 1989a). Elles représentent 20% des protéines totales du lait et sont composées principalement de la  $\beta$ -lactoglobuline (50%), l' $\alpha$ -lactalbumine (12%), la sérum albumine bovine (BSA) (5%), les immunoglobulines (10%), les protéines mineures (moins de 5%) et les protéose-peptones (fragments de caséines; 15-20%) (Morr, 1989; Goff et Hill, 1993). Parmi ces protéines, la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine sont les protéines qui influencent le plus les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles du lactosérum, de même que le comportement des protéines du lactosérum lors des traitements industriels. Les caractéristiques de ces deux protéines seront donc présentées plus en détails.

### 2.2.1 La $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg)

La  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg), principale protéine du lactosérum, est constituée de 162 résidus d'acides aminés et possède une masse moléculaire de 18 300 da. Jusqu'à maintenant, 9 variants génétiques ont été identifiés chez cette protéine, les variants A et B étant les plus fréquents. La différence entre ces deux variants génétiques provient de la substitution des

**Tableau 5:** Comparaison de la composition d'une poudre de lactosérum, de concentrés de protéines du lactosérum (CPL) et d'un isolat de protéines du lactosérum (IPL)<sup>1</sup>.

<b>Constituants (% p/v)</b>	<b>Poudre de lactosérum</b>	<b>CPL-35</b>	<b>CPL-80</b>	<b>IPL</b>
<b>Protéines</b>	15	35	80	96
<b>Lactose</b>	75	55	6	< 1
<b>Lipides</b>	1	3	8	< 1
<b>Minéraux</b>	9	7	6	3

<sup>1</sup> Tiré de Mangino (1992); Fiches techniques des produits de la compagnie Davisco International, Inc. (Le Sueur, MN).

résidus d'acides aminés ASP<sub>64</sub> et VAL<sub>118</sub> dans le variant A, par les résidus GLY<sub>64</sub> et ALA<sub>118</sub> dans le variant B. Elle possède un groupement thiol libre en position 121 (McKenzie et al., 1972) et sa structure tertiaire est stabilisée par la présence de deux ponts disulfures (Kinsella, 1988), localisés en position CYS<sub>66</sub>-CYS<sub>160</sub> et CYS<sub>106</sub>-CYS<sub>119</sub> (Papiz et al., 1986). La structure secondaire de la  $\beta$ -lg est constituée d'environ 15% d'hélice  $\alpha$ , 51% de feuillet  $\beta$ , 17% de courbure  $\beta$  et 17% de structure désordonnée (Creamer et al., 1983). Au niveau de sa structure tertiaire, elle présente la forme d'une poche ou d'un calice hydrophobe, constitué principalement par les feuillets  $\beta$  (Figure 1).

La structure quaternaire de la  $\beta$ -lg varie selon le pH, tel qu'illustré à la Figure 2. Entre pH 3.0 et 7.0, la  $\beta$ -lg se présente sous la forme de dimères (Pessen et al., 1985) due à des interactions électrostatiques et hydrophobes entre des résidus localisés à la surface des monomères (Creamer et al., 1983; Papiz et al., 1986). Cependant à basse température (0-4°C), pour des concentrations en  $\beta$ -lg de l'ordre de 15 g/l et à pH entre 3.7 et 5.1, la protéine est sous forme d'octamère, les monomères se liant entre eux par des liaisons hydrogènes. À des pH inférieurs à 3.0, une dissociation réversible des dimères se produit suite à des répulsions électrostatiques entre les sous-unités (Creamer et al., 1983). À pH supérieur à 6.5, les dimères passent graduellement à l'état monomérique, cette structure étant prédominante à pH 7.5. À ce pH, il se produit aussi une transformation réversible, appelée transition de Tanford. Cette transition implique l'exposition et l'ionisation d'un groupement carbonyle, qui augmente la réactivité du groupement thiol libre et mène à l'exposition partielle d'un résidu tyrosine (Tanford et al., 1959; McKenzie, 1971). À des pH supérieurs à 8.0, la dénaturation irréversible débute et conduit à la formation d'agrégats. Selon Swaisgood (1982), la rupture des ponts disulfures, l'oxydation du groupement thiol libre et des échanges entre les groupes SH et SS seraient responsables de la dénaturation irréversible de la  $\beta$ -lg à ces valeurs de pH.

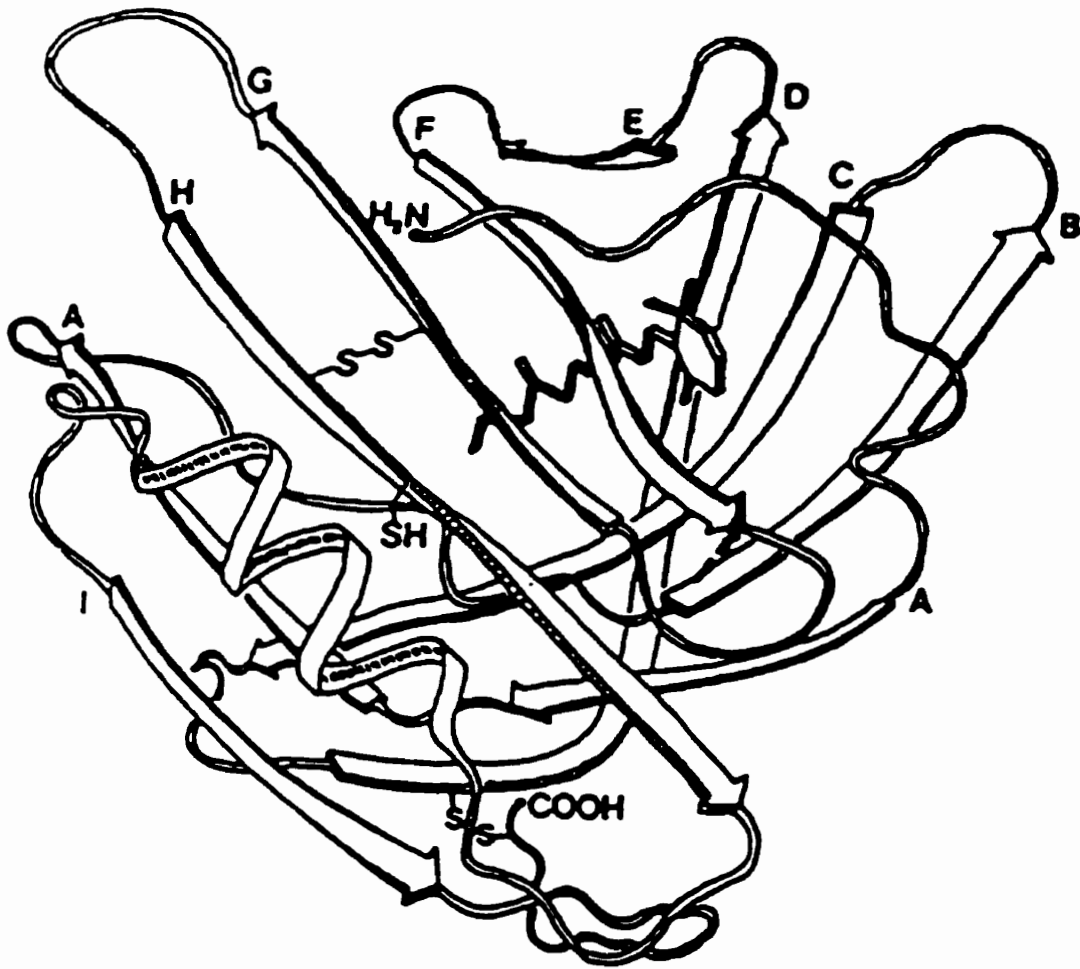
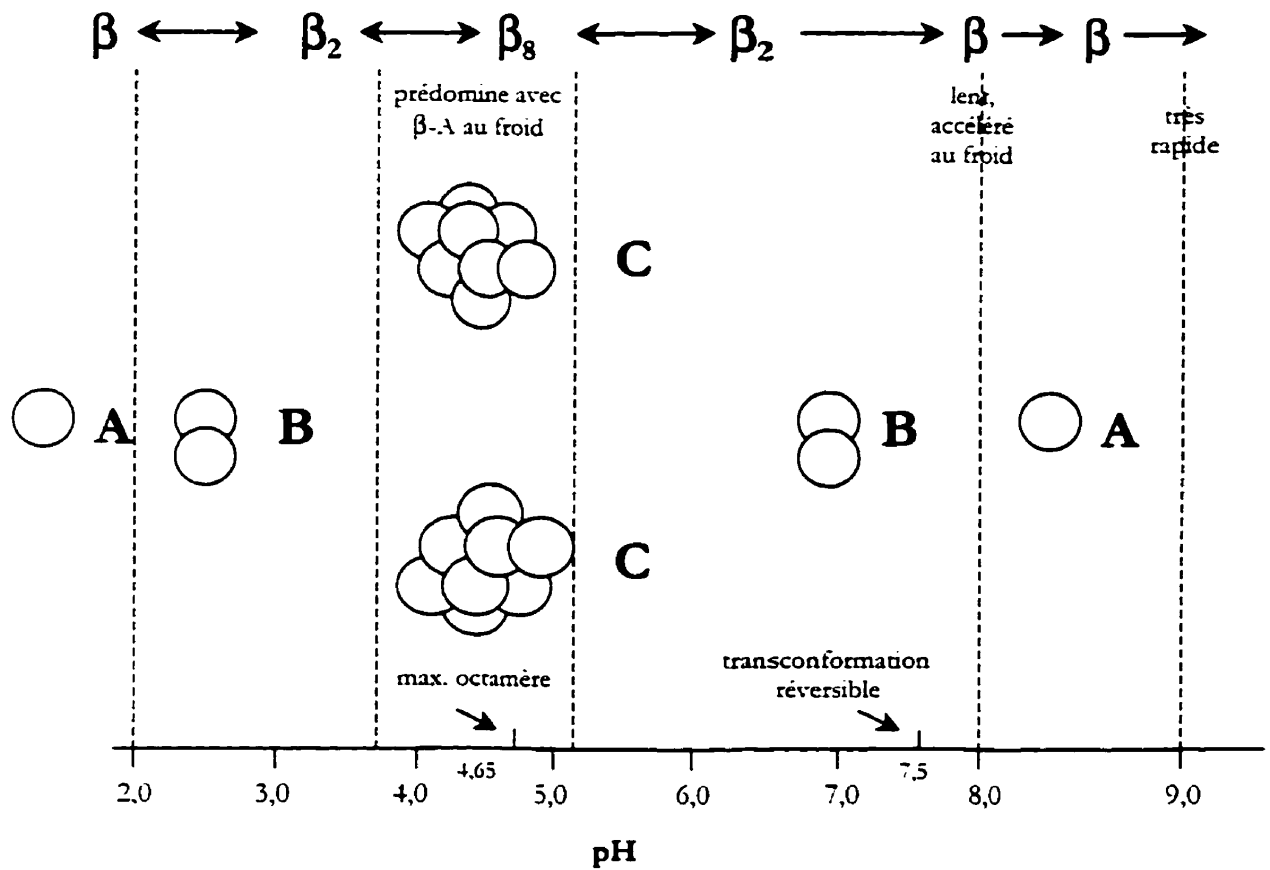


Figure 1: Représentation schématique de la structure tertiaire de la  $\beta$ -lactoglobuline, montrant la liaison d'une molécule de rétinol. Adapté de Papiz et al. (1986).





**Figure 2:** Représentation schématique des changements de structure quaternaire de la  $\beta$ -lactoglobuline en fonction du pH. Monomère (A); Dimère (B); Octamère (C). Adapté de Pessen et al. (1985).

Bien que le rôle physiologique de la  $\beta$ -lactoglobuline soit encore mal défini (Hambraeus, 1992), cette protéine est d'une très grande qualité nutritive grâce à son contenu élevé en acides aminés essentiels (Morr, 1989; Hambling et al., 1992), notamment la leucine et la lysine. De plus, elle est riche en méthionine et en cystéine, principales sources de soufre chez l'humain (Dibley, 1997). Selon Creamer et MacGibbon (1996), une des fonctions de la  $\beta$ -lg bovine serait de lier et protéger le rétinol (vitamine A), précieux constituant du lait de vache. En effet, sa ressemblance avec la RBP (Retinol Binding Protein) et d'autres protéines appartenant à la famille des protéines liant des molécules hydrophobes suggère qu'une des fonctions physiologiques de la  $\beta$ -lg serait le transport du rétinol. De récentes études démontrent aussi l'intérêt de cette protéine comme réservoir de peptides bioactifs. En effet, la production d'un peptide à activité opioïde, le  $\beta$ -lactorphin (102-105), a été obtenu suite à l'hydrolyse *in vitro* de la  $\beta$ -lg à l'aide de la trypsine et de la pepsine (Korhonen et al., 1998). De même, suite à l'hydrolyse trypsique de la  $\beta$ -lg, Mullaly et al. (1997) ont démontré l'activité antihypertensive du fragment 142-148. Ce peptide permettrait l'inhibition de l'angiotensine (ACE), une enzyme impliquée dans la régulation de la pression sanguine. L'activité antihypertensive du fragment 78-80 de la  $\beta$ -lg a également été démontrée par les travaux de Abubakar et al. (1998).

En raison de sa structure particulière, la  $\beta$ -lg possède la capacité de lier des acides gras et des composés aromatiques (de Wit, 1989a; Korhonen et al., 1998; Lubbers et al., 1998). La liaison de ces molécules à la  $\beta$ -lg augmenterait sa stabilité thermique (Puyol et al., 1994) et sa résistance à la dégradation enzymatique (Puyol et al., 1993). Il a aussi été démontré que certains composés sont en mesure d'interagir avec la  $\beta$ -lg et de contribuer à la stabilisation de sa structure tridimensionnelle. Toutefois, la  $\beta$ -lg est absente du lait humain et elle est considérée comme l'allergène le plus important du lait de consommation (Schmidt et Poll, 1991; Nakamura et al., 1993b; Ena et al., 1995; Aimutis, 1998).

### 2.2.2 L' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -la)

L' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -la), seconde protéine en importance dans le lactosérum, est une protéine globulaire compacte relativement stable à la chaleur (Brew et Grobler, 1992; Creamer et MacGibbon, 1996). Elle est constituée de 123 résidus d'acides aminés et possède un poids moléculaire de 14 200 da. Il existe 2 variants génétiques (A et B) de l' $\alpha$ -la qui diffèrent dans leurs séquences en acides aminés par la substitution du résidu ARG<sub>10</sub> dans le variant B, par un résidu GLN<sub>10</sub> dans le variant A. De plus, les séquences en acides aminés de l' $\alpha$ -la humaine et bovine sont homologues à 72% (Dibley, 1997). La structure secondaire de cette protéine est constituée de 26% d'hélice  $\alpha$ , 14% de feuillet  $\beta$  et de 60% de structure désordonnée (Creamer et al., 1983). Il s'agit d'une métalloprotéine qui contient un atome de calcium et dont la structure est stabilisée par la présence de 4 ponts disulfures. Cette protéine intervient principalement à titre de cofacteur dans la biosynthèse du lactose, à partir du galactose et du glucose (de Wit, 1989a; Brew et Grobler, 1992; Creamer et MacGibbon, 1996; de Wit, 1998).

### 2.3 La stabilité thermique des protéines du lactosérum

Les traitements thermiques affectent la structure des protéines de façon réversible ou irréversible. La réversibilité de la dénaturation est dictée par la séquence des acides aminés, l'état natif de la protéine et son environnement chimique tels le pH, la concentration en protéines et la force ionique (Kinsella, 1984). Selon de Wit (1998), la dénaturation des protéines du lactosérum se fait en deux étapes: premièrement, on assiste au déplissement de la structure tertiaire des protéines, qui peut être réversible ou non, suivie par la dénaturation irréversible des protéines via l'agrégation des molécules.

Les études menées sur la dénaturation thermique des protéines du lactosérum, et plus particulièrement de la  $\beta$ -lg, ont fait l'objet de nombreux travaux (Renard, 1994; Hoffmann, 1997). En fait, la teneur élevée (>50%) en  $\beta$ -lg des protéines du lactosérum influence fortement la thermosensibilité et le comportement des ingrédients à base de protéines du

lactosérum lors des traitements thermiques (de Wit et Hontelez-Backx, 1981; Kinsella, 1984).

À des températures supérieures à 60°C et à pH 8.0, la  $\beta$ -lg subit une dénaturation irréversible (Evans, 1982; Hambling et al., 1992; Galani et Owusu Apenten, 1996). Au-dessus de cette température, on assiste au bris des ponts disulfures intramoléculaires et à l'apparition de groupements thiols libres hautement réactifs. Ces groupements conduisent à la polymérisation de la  $\beta$ -lg et à la production d'agrégats insolubles (Lee et al., 1992; Xiong, 1992), via la formation de liens disulfures intermoléculaires (Evans, 1982; Creamer et MacGibbon, 1996). Lors d'un chauffage (15 à 30 minutes) à 70-85°C en milieu acide (pH 4.5), la  $\beta$ -lg se présente sous forme dénaturée et insoluble. À ce pH, il y aurait coagulation des protéines par agrégation et formation de liens disulfures intermoléculaires avec des protéines voisines. Par ailleurs, suite à un chauffage à 80°C à pH neutre (6.8-7.5), la  $\beta$ -lg serait partiellement dénaturée, sans agrégation ni perte de solubilité. Il semble que pour ces valeurs de pH, le groupement thiol soit démasqué et activé, provoquant ainsi un réarrangement des ponts disulfures intermoléculaires qui contribuent alors à stabiliser la molécule (de Wit et Klarenbeek, 1981; Pearce, 1989).

Dans le cas de l' $\alpha$ -lactalbumine, elle possède une température de dénaturation supérieure à celle de la  $\beta$ -lg, soit 75-80 °C. En raison de sa faible taille et de la présence de 4 ponts disulfures, l' $\alpha$ -la est dénaturée de façon réversible lorsqu'elle est exposée à des températures autour de 62°C à pH 6.5; cette protéine retrouve donc sa conformation native après refroidissement (Kinsella, 1984; de Wit, 1989a; Brew et Grobler, 1992).

L'un des problèmes majeurs des protéines du lactosérum est donc leur manque de stabilité lors des traitements thermiques. La présence de certains agents chimiques influence toutefois la stabilité de ces protéines. Ainsi, la présence de sucres (ex.: sucrose, lactose), de polyols (ex.: glycérol) et de sels ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) aurait pour effet de protéger les protéines, dont la  $\beta$ -lg, et d'augmenter leur stabilité à la chaleur (Evans, 1982; Hambling et al., 1992; Jelen, 1992; Mangino, 1992; Creamer et MacGibbon, 1996). Dans le cas des sucres et des

alcools, ils permettraient d'augmenter la structure de l'eau et de renforcer les interactions hydrophobes responsables de la conformation des protéines (de Wit, 1989a; Kinsella et al., 1989). Les sels minéraux pour leur part, augmenteraient la température de dénaturation des protéines du lactosérum. En effet, Boye et al (1995) ont démontré une augmentation de la température de dénaturation de ces protéines de 76,3°C à 82°C et 85,3°C, pour des concentrations en NaCl de 0, 1 et 2N. Les sels dissous auraient également un effet sur la température de dénaturation de la  $\beta$ -lg. À pH constant, l'accroissement des teneurs en ions  $\text{Ca}^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  conduit à une augmentation de la température de dénaturation de la  $\beta$ -lg (Harwalkar et Ma, 1990); la conformation de cette protéine serait alors affectée par des interactions électrostatiques entre les groupements chargés.

Enfin, des travaux réalisés par Barbeau et al. (1996) ont démontré que les fragments 41-60 et 21-40 de la  $\beta$ -lg, isolés d'un hydrolysate tryptique de protéines du lactosérum, permettent d'améliorer la stabilité thermique de cette protéine et ce, par voie d'interactions spécifiques (ionique ou hydrophobe). Selon ces auteurs, le caractère hydrophobe de ces peptides leur permettraient d'interagir avec le cœur hydrophobe de la  $\beta$ -lg, stabilisant ainsi la conformation de la protéine (Barbeau et al., 1996).

## **2.4 Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum**

Les propriétés fonctionnelles des protéines se définissent comme des propriétés, autres que nutritionnelles, qui influencent les caractéristiques d'un système alimentaire et qui ont un impact sur sa structure, sa texture, son apparence, sa saveur ou sa viscosité (Morr et Ha, 1993; Vojdani et Whitaker, 1994). En général, elles sont classées en deux groupes distincts: 1) les propriétés d'hydratation telles la solubilité, la dispersibilité, la viscosité et la gélification et 2) les propriétés de surface, incluant le moussage et l'émulsification. Ces propriétés sont dépendantes de la température, du pH et de la force ionique, de même que de la présence d'autres composés dans le milieu: protéines, lipides, hydrocolloïdes, sucres, calcium ou autres ions (Morr et Ha, 1993; Burrington, 1998b; de Wit, 1998).

De façon générale, les protéines du lactosérum ont une bonne capacité de rétention d'eau et sont solubles sur une gamme étendue de pH (2 à 10) (Cheftel et Lorient, 1982; Mangino, 1992; Morr et Ha, 1993). Selon de Wit et al. (1986), la solubilité est le facteur qui gouverne les autres propriétés fonctionnelles des protéines. Une protéine doit d'abord être soluble dans un système alimentaire afin d'interagir avec les autres molécules en solution. Toutefois, une solubilité totale des protéines n'est pas indispensable pour l'expression de leur fonctionnalité (Mangino, 1992). Les travaux de Hermansson (1973) ont démontré que la solubilité des protéines du lactosérum était influencée par le pH et la force ionique du milieu. Lorsque des sels sont ajoutés progressivement à une solution de lactosérum déminéralisé (>90%), pour des valeurs de pH comprises entre 4.5 et 5.5, deux effets sont observés: premièrement, la solubilité des protéines augmente (salting-in) pour atteindre un maximum au delà duquel elle diminue (salting-out). Le phénomène de salting-in est généralement considéré comme une amélioration nette de la solubilité des protéines, basée sur des interactions électrostatiques non spécifiques entre des protéines chargées et leur environnement (de Wit, 1989a).

Les protéines du lactosérum sont reconnues pour leur aptitude à donner des solutions peu visqueuses et pour leur facilité à gélifier sous des conditions appropriées. La formation d'un gel de protéines survient principalement en raison de l'augmentation des interactions protéine-protéine, au détriment des interactions protéine-solvant (eau) (Gault et Fauquant, 1992; Mangino, 1992; Robin et al., 1993; Mahmoud, 1994; Boye et al., 1995). Bien que le mécanisme de gélification n'est toujours pas élucidé, il est admis que ce processus se fait en deux étapes: la dénaturation (ou déplissement) des protéines, puis l'agrégation (ou association) des molécules dénaturées (de Wit, 1989a; Mangino, 1992) avec emprisonnement de molécules d'eau.

La gélification des protéines du lactosérum s'observe généralement à des températures supérieures à 70°C. À ces températures, on assiste au déplissement des protéines, à l'exposition de nombreux sites réactifs et à la formation d'interactions intermoléculaires (Aguilera, 1995). Lorsque des ponts disulfures sont formés, les gels de protéines du lactosérum sont thermoirréversibles, alors qu'ils demeurent réversibles lorsque des liaisons

hydrogènes sont impliquées (Gault et Fauquant, 1992; Robin et al., 1993). Enfin, la gélification des protéines du lactosérum peut être induite par divers moyens chimiques et physiques incluant les traitements thermiques, l'ajout de calcium, l'ajout d'acides ou d'autres agents déstabilisants, l'oxydation chimique et les traitements enzymatiques (Mangino, 1992; Ju et al., 1997).

Les protéines du lactosérum sont également reconnues pour leur capacité à former des mousses et des émulsions. À des concentrations relativement basses, ces protéines ont la capacité de s'adsorber aux interfaces air/eau et huile/eau d'un aliment et de réduire la tension interfaciale du milieu (Graham et Phillips, 1979; Phillips, 1981; Morr et Ha, 1993). Cependant, la stabilité des mousses et des émulsions préparées avec ces protéines est généralement faible (Kinsella, 1981; 1984; Kinsella et al., 1989; de Wit, 1989a; Mangino, 1992; Morr et Ha, 1993). D'autre part, Shimizu et al. (1981) ont démontré que les protéines du lactosérum adsorbées à la surface de globules de gras étaient hydrolysées plus facilement par des protéases que lorsqu'elles se trouvent en solution; ces résultats indiquent donc que l'adsorption des protéines du lactosérum aux interfaces induit des changements de la conformation de ces protéines.

## **2.5 La qualité nutritionnelle des protéines du lactosérum**

Selon Giese (1994), la qualité nutritionnelle d'une protéine est basée sur trois facteurs: (1) sa teneur en acides aminés essentiels, (2) sa digestibilité et (3) la biodisponibilité de ses acides aminés. En raison de leur teneur élevée en acides aminés essentiels, notamment la lysine, la leucine et la thréonine, les protéines du lactosérum présentent une valeur nutritionnelle supérieure à celle des caséines ou des protéines d'origine végétale (Cheftel et Lorient, 1982; Hambraeus, 1992; Swartz, 1995; de Wit, 1998). On note au Tableau 6 qu'à l'exception des acides aminés phénylalanine+tyrosine, les teneurs en acides aminés essentiels des protéines du lactosérum dépassent largement celles de la protéines de référence proposée par l'organisation mondiale de la FAO/WHO/UNU (1985). Elles sont donc utilisées abondamment dans les produits alimentaires afin d'en rehausser la valeur nutritive.

**Tableau 6:** Composition en acides aminés essentiels de la protéine de référence proposée par la FAO/WHO/UNU (1985) et de quelques protéines alimentaires<sup>1</sup>.

<b>Acides aminés</b>	<b>Protéines du lactosérum</b>	<b>Caséines</b>	<b>Protéines de soya</b>	<b>Protéines de blé</b>	<b>FAO/WHO/UNU (1985)</b>
<b>Isoleucine</b>	76	54	51	34	46
<b>Leucine</b>	118	95	82	69	93
<b>Lysine</b>	113	81	68	23	66
<b>Méthionine + Cystéine</b>	52	32	33	36	42
<b>Phénylalanine + Tyrosine</b>	70	111	95	77	72
<b>Thréonine</b>	84	47	41	28	43
<b>Tryptophane</b>	24	16	14	10	17
<b>Valine</b>	72	75	52	38	55
<b>Total</b>	609	511	466	336	424

<sup>1</sup> Tiré de Hambraeus (1992); Damodaran (1996).



Le Tableau 7 présente la valeur nutritive de quelques protéines alimentaires déterminée à l'aide des principales méthodes utilisées dans le domaine alimentaire: l'indice chimique (IC), le coefficient d'efficacité protéique (CEP), le «protein digestibility corrected amino acid score» (PDCAAS) et la valeur biologique (VB). L'indice chimique est une méthode simple et rapide basée sur la comparaison de la composition en acides aminés essentiels de la protéine étudiée avec celle d'une protéine de référence de très grande qualité. Cet indice n'utilise que l'acide aminé limitant pour prédire la qualité nutritive d'une protéine et ne donne aucune information sur la disponibilité des acides aminés. Le CEP est une méthode basée sur la mesure du gain de poids d'un rat blanc en croissance, suivant son alimentation pendant 28 jours à l'aide d'une ration contenant la protéine à l'étude. Dans le cas du PDCAAS, il s'agit d'une nouvelle méthode qui tient compte non seulement de la comparaison de la composition en acides aminés essentiels de la protéine à l'étude, mais aussi des besoins en protéines de l'organisme humain. Enfin, la valeur biologique est une méthode de bilan azoté basée sur la mesure de la quantité d'azote absorbé et excrété (urine, fèces) suivant l'alimentation de rats en croissance à partir d'une ration contenant la protéine à l'étude. Au tableau 7, on remarque que les protéines du lactosérum se classent au premier (IC, PDCAAS, VB) ou au deuxième rang (CEP) en terme de qualité nutritive et ce, peu importe la méthode utilisée pour quantifier leur valeur nutritionnelle.

En plus de leur valeur nutritive, les protéines du lactosérum sont bénéfiques à la santé des individus et ce, sous plusieurs aspects. De nombreux travaux ont démontré une relation étroite entre l'ingestion des protéines du lactosérum et l'amélioration de certains états pathologiques. Par exemple, la richesse en calcium du lactosérum en fait un ingrédient de choix pour les individus souffrant d'ostéoporose (van Moursel, 1997). Les protéines du lactosérum sont aussi reconnues pour diminuer les concentrations plasmiqes en cholestérol (Zhang et Beynen, 1993). En effet, les travaux de Tseng et al. (1990) ont démontré que chez le nourrisson, l'ingestion de formules lactées à base de protéines du lactosérum, plutôt qu'à base de caséines, permettrait d'abaisser le taux plasmatique du cholestérol.

**Tableau 7:** Comparaison de la valeur nutritive de quelques protéines alimentaires à partir de différents indices: indice chimique (IC), coefficient d'efficacité protéique (CEP), «protein digestibility corrected amino acid score» (PDCAAS) et valeur biologique (VB)<sup>1</sup>.

<b>Indices Protéines</b>	<b>IC (%)</b>	<b>CEP</b>	<b>PDCAAS</b>	<b>VB (%)</b>
<b>Œuf entier</b>	100	3.9	1.00	94
<b>Blé (gluten)</b>	40	1.1	0.40	52
<b>Caséines</b>	91	2.5	1.00	85
<b>Lactosérum (concentré)</b>	117	3.2	1.00	95
<b>Riz</b>	59	1.3	0.55	64
<b>Soya (isolat)</b>	74	2.1	0.92	80

<sup>1</sup> Tiré de Damodaran (1996); Dibley (1997).

Des propriétés immunologiques ont également été démontrées pour certaines composantes protéiques du lactosérum (Juto et Ogra, 1978; Watson, 1990; Barta et al., 1991; Wong et Watson, 1995). Par exemple, les immunoglobulines (Ig) bovines ont été reconnues pour être efficaces contre certains types d'entéropathies chez l'humain (Hilpert et al., 1977; Brüssow et al., 1987; Hilpert et al., 1987; Tacket et al., 1988). Chez l'animal, l'effet protecteur des anticorps du lactosérum contre plusieurs types d'infections a aussi été démontré par plusieurs chercheurs (Bridger et Brown, 1981; Saif et al., 1983; Michalek et al., 1987). L'effet bénéfique des protéines du lactosérum chez des patients atteints du SIDA a aussi été démontré par les travaux de Bounous et al. (1993). Ces auteurs ont démontré que l'ajout de protéines du lactosérum non-dénaturées à l'alimentation des patients pour une durée de 3 mois, permettait d'augmenter progressivement leur poids corporel et de normaliser le contenu en glutathion des cellules mononuclées chez ces patients.

En raison de leur excellente qualité nutritionnelle et de leur nombreuses propriétés biologiques, les protéines du lactosérum sont donc un ingrédient de choix pour la formulation d'aliments fonctionnels et de produits nutraceutiques. À l'heure actuelle, ces protéines sont avantageusement utilisées dans les boissons nutritionnelles, incluant les formules lactées pour nourrissons, les préparations gériatriques, les boissons pour sportifs, les produits pour les individus sous régime amaigrissant, de même que dans une vaste gamme d'aliments fortifiés et de produits «santé».

### **3. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PROTÉINES DU LACTOSÉRUM**

#### **3.1 Hydrolyse enzymatique des protéines**

De nombreux procédés ont été mis au point en vue d'améliorer la qualité nutritionnelle (valeur nutritive, digestibilité, propriétés allergéniques) et les propriétés fonctionnelles des protéines et ce, afin d'augmenter leur utilisation à titre d'ingrédients alimentaires. Ces procédés incluent des modifications physiques, chimiques, enzymatiques et génétiques et ont été revus par de nombreux auteurs (Kinsella, 1976; Feeney et al., 1982; Fox et al., 1982; Kinsella et al., 1989; Nakai et Li-Chan, 1989; Lakkis et Villota, 1992; Grasset et Bovetto,

1993; Vojdani et Whitaker, 1994; Chobert et al., 1996). Parmi ces procédés, l'hydrolyse enzymatique est la méthode la mieux adaptée au domaine alimentaire. En effet, contrairement à l'hydrolyse chimique, l'utilisation d'enzymes permet de modifier les protéines dans des conditions réactionnelles douces, et ne cause pas de destruction ou de racémisation des acides aminés; la qualité nutritionnelle de la protéine originale est donc maintenue (Stanley, 1981; Adler-Nissen, 1986a; Visser et al., 1993; Yeom et al., 1994). De plus, cette méthode permet de limiter la formation de produits secondaires dans le produit et de contrôler le degré d'hydrolyse des protéines de même que la taille des molécules libérées et ce, par un choix judicieux de la spécificité de l'enzyme et des conditions expérimentales (ratio enzyme:substrat, pH, température, force ionique, etc.).

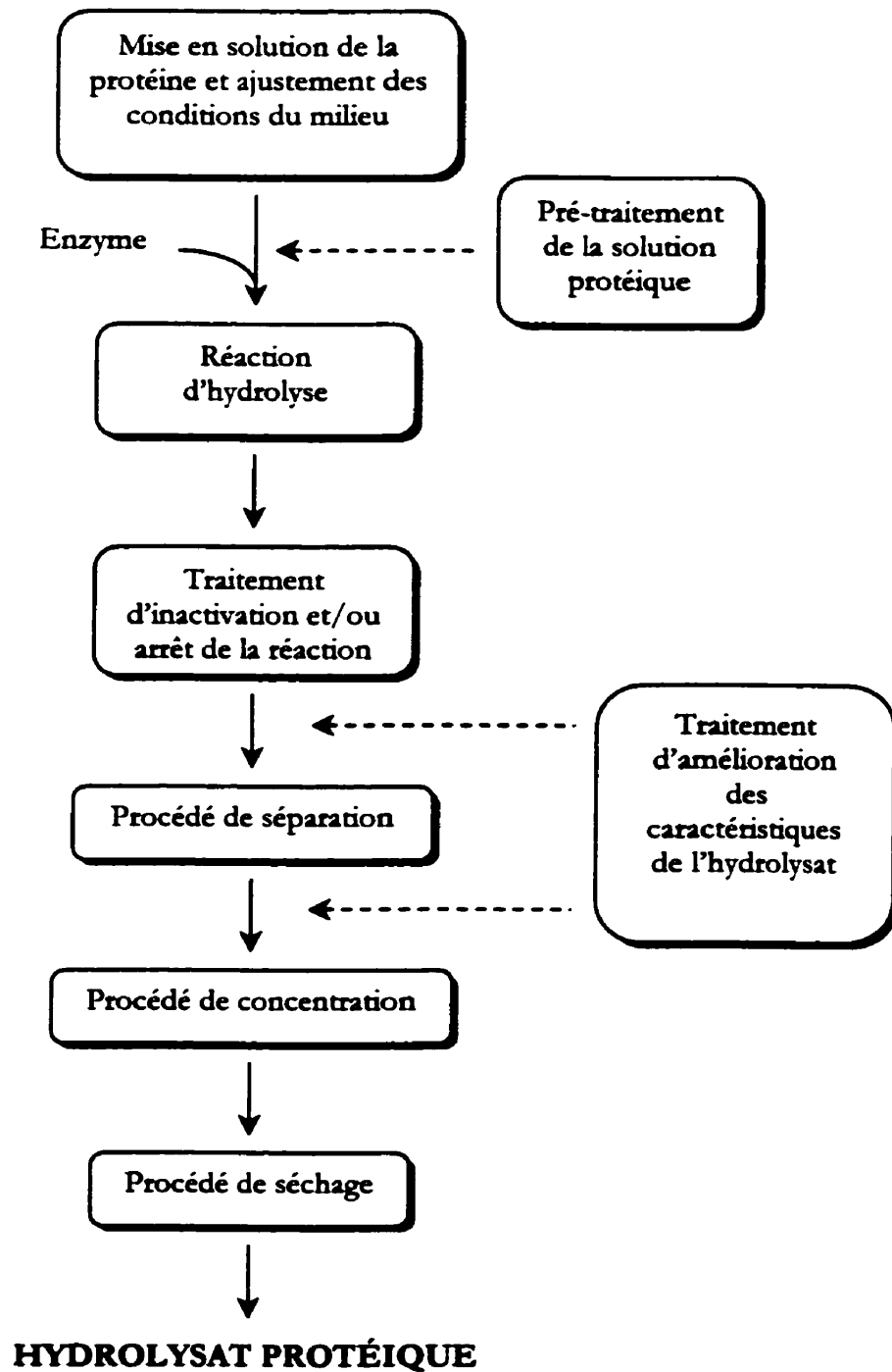
L'orientation d'un hydrolysats enzymatique de protéines vers des utilisations alimentaires ou nutritionnelles spécifiques repose sur son procédé de fabrication et sur certaines de ses caractéristiques (Mahmoud, 1994). Par exemple, les hydrolysats possédant un degré d'hydrolyse faible (DH 3-5%) ou de valeur intermédiaire (DH 10-15%) sont généralement utilisés pour leurs propriétés fonctionnelles ou dans certaines formules diététiques et suppléments alimentaires. Ceux dont le degré d'hydrolyse est plus élevé (DH >20%) sont plutôt utilisés dans les formules hypoallergéniques et dans les produits destinés à l'alimentation parentérale (Swartz, 1995).

De façon générale, l'hydrolyse enzymatique des protéines est obtenue à l'aide de protéases. Ces enzymes catalysent le bris des liens peptidiques de la protéine selon des sites spécifiques à leur activité et conduisent à la libération de peptides et d'acides aminés en proportions variables (Adler-Nissen, 1986a). Selon Panyam et Kilara (1996), le bris des liens peptidiques mène à trois modifications majeures ayant un impact sur la fonctionnalité des protéines: (1) l'augmentation du nombre de groupements ionisables ( $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$ ), ce qui augmente l'hydrophilicité et la charge nette des molécules (Mahmoud, 1994), (2) la diminution du poids moléculaire des chaînes peptidiques pouvant réduire l'allergénicité des protéines et (3) l'exposition des régions hydrophobes, initialement enfouies à l'intérieur de la protéine, suite à la modification de sa conformation.

Lors de l'hydrolyse enzymatique d'une protéine, le contrôle des conditions d'hydrolyse est important pour l'optimisation de la réaction et l'obtention de produits possédant les caractéristiques souhaitées (Adler-Nissen, 1986a; Mahmoud, 1994). L'efficacité d'une réaction enzymatique dépend de nombreux facteurs, dont la spécificité de l'enzyme pour son substrat, la nature du substrat et son état natif ou dénaturé, le pH, la température, le ratio enzyme:substrat et la force ionique du milieu. Lorsqu'une enzyme est maintenue dans des conditions physico-chimiques idéales, son activité est optimisée. Pour maintenir l'activité optimale d'une enzyme, il faut également éviter les températures et les valeurs de pH extrêmes, la présence d'inhibiteurs et la création d'interfaces (air/eau, huile/eau, surface/eau) (Lahl et Braun, 1994).

La Figure 3 présente le procédé industriel pour la fabrication d'un hydrolysats enzymatique de protéines. De façon générale, l'hydrolyse d'une protéine implique sa mise en solution, l'ajustement des conditions du milieu ( $T^{\circ}$ , pH, etc.) et la retenue du mélange dans une cuve thermostatée pour la durée de la réaction d'hydrolyse (1 à 24 heures). Selon la protéine et l'enzyme utilisées, ainsi que de l'utilisation envisagée, certains traitements sont parfois appliqués au mélange protéique en amont ou en aval de la réaction d'hydrolyse. Par exemple, la réaction d'hydrolyse peut être accélérée par le traitement thermique préalable d'une protéine native, peu susceptible à l'action d'une enzyme particulière. De plus, la composition d'un hydrolysats protéique, en terme de poids moléculaire de ces composantes peptidiques, peut être ajustée par ultrafiltration du mélange hydrolysé afin de répondre à des exigences particulières (ex.: application nutritionnelle).

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



**Figure 3:** Représentation schématique du procédé de fabrication industrielle d'un hydrolysate enzymatique de protéines. Adapté de Gauthier (1996).

Le coût des enzymes est un critère très important pour la préparation d'un hydrolysats protéique à l'échelle industrielle et ce dernier est très variable selon la source enzymatique. Par exemple, le coût de la Chymotrypsine bovine de la compagnie Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Denmark) est de 1168\$/kg, alors que celui de l'Alcalase, une protéase d'origine bactérienne dérivée de *Bacillus licheniformis* et provenant de la même compagnie, est de seulement 35\$/kg. Cependant, cette préparation enzymatique étant moins pure, des ratios enzyme:substrat plus élevés doivent être utilisés.

### 3.2 Caractérisation des hydrolysats enzymatiques de protéines

En cours de procédé, la cinétique d'hydrolyse d'une protéase peut être suivie par différentes méthodes. La plus courante de ces méthodes est la technique du pH-stat proposée par Adler-Nissen (1977). Cette technique consiste à mesurer la quantité de base nécessaire pour maintenir constant le pH du milieu réactionnel tout au long de l'hydrolyse. La mesure du degré d'hydrolyse par cette méthode est effectuée en milieu neutre ou légèrement alcalin, où il y a dissociation des groupes aminés et libération de protons lors de l'hydrolyse d'un lien peptidique. Le degré d'hydrolyse (DH), défini comme le pourcentage de liens peptiques hydrolysés par rapport au nombre total de ces liens dans la protéine, peut être calculé à partir de l'équation suivante (Adler-Nissen, 1986a):

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

où : B est la consommation de base (ml);  $N_b$  est la normalité de la base utilisée;  $\alpha$  est le degré de dissociation des groupements aminés ( $1/\alpha=1,2$  dans le cas des protéines laitières); MP est la masse de protéines (g);  $h_{\text{tot}}$  est le nombre total de liens peptiques dans le substrat (8,0 meq/kg pour les protéines du lactosérum).

Le suivi d'une réaction d'hydrolyse peut également être effectué par osmométrie, une méthode basée sur la baisse du point de congélation d'une solution. En cours de réaction, l'hydrolyse des liens peptiques d'une protéine mène à la libération de molécules

additionnelles dans le milieu, laquelle se traduit par une baisse de son point de congélation; cette valeur est alors utilisée pour le calcul du degré d'hydrolyse selon l'équation suivante:

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

où :  $\Delta C$  est la baisse du point de congélation (mosmol); P est la concentration en protéines (g/1000 ml H<sub>2</sub>O);  $1/\omega$  est le facteur de calibration de l'osmomètre (égal à 1,04);  $h_{tot}$  est le nombre total de liens peptiques dans le substrat (8,0 meq/kg pour les protéines du lactosérum).

Le degré d'hydrolyse des protéines peut aussi être déterminé à partir de l'augmentation du nombre de groupements aminés libres dans le milieu suite à l'hydrolyse des liens peptidiques et ce, par leur réaction avec des réactifs spécifiques aux amines primaires comme l'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS) et l'o-phthaldialdéhyde (OPA). La méthode TNBS est toutefois longue et fastidieuse en raison de l'étape de chauffage des échantillons et de leur protection contre la lumière. Dans le cas de la méthode OPA, elle est plus simple, plus rapide et moins variable que la méthode TNBS. Il est à noter que ces méthodes sont rarement utilisées pour caractériser les hydrolysats protéiques en cours de réaction.

Un autre indice couramment rapporté sur les fiches techniques des hydrolysats commerciaux est le ratio AN/TN. Ce ratio est une mesure de la teneur en azote  $\alpha$ -aminé (AN) d'un échantillon, déterminée par un titrage à l'acide formique, divisée par sa teneur en azote total (TN), mesurée par la méthode Kjeldahl, et exprimé en pourcentage. Le ratio AN/TN n'est pas un degré d'hydrolyse et il ne peut être utilisé en cours de réaction d'hydrolyse. Il se calcule de la façon suivante (Adler-Nissen, 1986a):

$$\frac{AN}{TN} (\%) = \frac{\text{Teneur en azote } \alpha\text{-aminé}}{\text{Teneur en azote total}} \times 100$$



Enfin, dans le cas des hydrolysats protéiques destinés à des applications nutritionnelles, ils sont aussi caractérisés en terme de profil du poids moléculaire de leurs composantes peptidiques. Par exemple, dans le cas des boissons pour sportifs, les peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da) sont recherchés pour leur absorption gastro-intestinale facilitée (Rouanet et al., 1990; Ziegler et al., 1990; Adachi et al., 1991; Motion, 1992; Grasset et Bovetto, 1993; Cordle, 1994) et leur teneur dans les hydrolysats protéiques est une donnée qui apparaît alors sur la fiche technique de ces produits. Actuellement, l'analyse du profil de poids moléculaires des composantes d'un hydrolysat protéique se fait par chromatographie d'exclusion moléculaire à haute performance (HPSEC). Cette méthode de séparation est basée sur les propriétés physiques des molécules (taille moléculaire) et non sur leurs propriétés chimiques comme pour la majorité des autres techniques chromatographiques. Toutefois, la chromatographie d'exclusion moléculaire est une méthode relativement variable et dont les résultats sont influencés par la solubilité de l'hydrolysat protéique dans la phase mobile utilisée pour l'analyse. Il faut donc être prudent dans l'interprétation des résultats obtenus avec cette méthode et il faut éviter de comparer les profils de poids moléculaires de différents hydrolysats obtenus par des méthodes HPSEC dont les conditions d'élution sont différentes.

### **3.3 Effet de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum**

Dans le domaine alimentaire, l'hydrolyse enzymatique est mise à profit afin de modifier les propriétés fonctionnelles de la protéine originale telles la solubilité, la viscosité, les propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes (Adler-Nissen, 1986a; Vegarud et al., 1991; Mahmoud, 1994; Panyam et Kilara, 1996). Les changements de propriétés fonctionnelles obtenus suite à l'hydrolyse enzymatique dépendent habituellement du degré d'hydrolyse des protéines et de la taille des molécules composant les hydrolysats protéiques. En effet, il semble exister un degré d'hydrolyse optimal au-delà duquel l'amélioration des propriétés fonctionnelles d'une protéine n'est plus possible; notons que ce degré d'hydrolyse optimal n'est pas le même suivant l'enzyme utilisée, la nature de la protéine et la propriété fonctionnelle recherchée (Kinsella et al., 1989).

L'amélioration de la solubilité des protéines par hydrolyse enzymatique a été rapportée par de nombreux chercheurs (Schmidt et Poll, 1991; Turgeon et al., 1992; Visser et al., 1993; Lahl et Braun, 1994; Slattery et Fitzgerald, 1998; Wu et al., 1998). Cet effet serait dû à la réduction de la taille des molécules (Turgeon et al., 1992) et à l'apparition de nouveaux groupements aminés et carboxyles sur ces molécules qui augmentent alors le caractère hydrophile du mélange (Mahmoud, 1994; Panyam et Kilara, 1996). La plus grande solubilité des hydrolysats au point isoélectrique des protéines permet notamment de les utiliser à plus forte concentration dans les boissons aux fruits à pH acide; cet effet permet également d'améliorer la stabilité thermique des protéines lors du traitement thermique (ex.: pasteurisation) de certains produits (Haque, 1993; Frøkjær, 1994; Mahmoud, 1994).

Les hydrolysats protéiques donnent habituellement des solutions moins visqueuses que celles à base de protéines intactes et ce, en raison de la réduction de la taille des molécules. Pour la même raison, on assiste généralement à la perte des propriétés gélifiantes d'une protéine suite à son hydrolyse (Mahmoud, 1994; Panyam et Kilara, 1996). En fait, une des propriétés uniques des hydrolysats protéiques est leur faible aptitude à la gélification thermique, permettant ainsi de les utiliser à plus forte concentration dans certains produits alimentaires. Toutefois, de nombreux travaux sur l'hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum ont démontré que certains hydrolysats présentent la capacité de former des gels (Chen et al., 1994; Ju et al., 1995; Otte et al., 1996a; 1996b; Ju et al., 1997; Otte et al., 1997; Ju et Kilara, 1998). Par exemple, Ju et al. (1995) ont démontré qu'une hydrolyse limitée des protéines du lactosérum pouvait influencer leur aptitude à la gélification thermique. Ces auteurs ont observé que des hydrolysats de protéines du lactosérum préparés à l'aide de l'Alcalase, une endoprotéase isolée de *Bacillus licheniformis*, formaient des gels à 40°C suite à leur mise en solution (3-12% protéines) à pH 7.0. Par contre, des hydrolysats préparés à l'aide de la Trypsine ou de la Neutrase® (*Bacillus subtilis*) ne gélifiaient pas dans les mêmes conditions. La spécificité des protéases utilisées pour la fabrication des hydrolysats serait donc un facteur important dans la modification des propriétés gélifiantes d'une protéine.

L'hydrolyse enzymatique des protéines est également utilisée en vue d'améliorer leurs propriétés moussantes et émulsifiantes (Vegarud, 1991; Lahl et Braun, 1994; Vojdani et Whitaker, 1994; Turgeon et al., 1995; Lieske et Konrad, 1996; Singh et Dalgleish, 1998; Wu et al., 1998). En fait, l'hydrolyse des liens peptidiques d'une protéine mène à l'exposition d'acides aminés hydrophobes, initialement enfouis au sein de la protéine, ce qui augmente l'hydrophobicité des molécules et leur affinité pour les interfaces (Panyam et Kilara, 1996). La structure des protéines étant moins flexible que celle des peptides, ces derniers peuvent donc atteindre plus rapidement un équilibre à l'interface de globules de gras (Adler-Nissen, 1986a).

Dans le cas des protéines du lactosérum, plusieurs travaux ont démontré que leur hydrolyse enzymatique pouvait conduire à des propriétés émulsifiantes supérieures à celles des protéines natives (Jost et Monti, 1982; Chobert et al., 1988; Turgeon et al., 1991; 1992; Gauthier et al., 1993; Singh et Dalgleish, 1998). Par exemple, Singh et Dalgleish (1998) ont démontré que des hydrolysats commerciaux de protéines du lactosérum (New Zealand Milk Products) permettaient de stabiliser des émulsions de type huile/eau et ce, pour des produits donc les degrés d'hydrolyse variaient entre 10 et 20%. D'autre part, Turgeon et al. (1992) ont démontré que deux peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la  $\beta$ -lg présentaient des propriétés interfaciales supérieures à celles de la protéine native. Ces peptides, correspondant aux fragments 21-40 et 41-60 de la  $\beta$ -lg, sont constitués de 20 résidus d'acides aminés et leur séquence primaire se caractérise par une alternance de zones hydrophobes et hydrophiles le long de la chaîne peptidique. À pH 4.0, ces auteurs ont démontré que la vitesse d'adsorption à un interface air/eau d'une fraction contenant plus de 95% du fragment 41-60 était 12 fois supérieure à celle de la  $\beta$ -lg native.

### **3.4 Effet de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés nutritionnelles des protéines du lactosérum**

L'hydrolyse enzymatique des protéines alimentaires permet d'améliorer leur digestibilité et/ou leur absorption gastro-intestinale (Ziegler et al., 1990; Motions, 1992; Grasset et

Bovetto, 1993 ; Cordle, 1994; Gonzalez-Tello et al., 1994; Schmidl et al., 1994; Swartz, 1995). En effet, Adachi et al. (1991) ont démontré que les acides aminés sous forme peptidique étaient absorbés et assimilés plus rapidement par l'organisme que les protéines intactes ou les mélanges d'acides aminés libres. Pour ces raisons, les hydrolysats enzymatiques de protéines sont utilisés comme principale source d'azote dans plusieurs mélanges nutritionnels, de même que dans les formulations diététiques destinées aux patients qui présentent des problèmes de malnutrition ou des désordres gastro-intestinaux (Frøkjær, 1994; Gonzalez-Tello et al., 1994; Swartz, 1995).

D'autre part, l'hydrolyse enzymatique des protéines est une méthode utilisée pour réduire les risques d'allergies aux protéines laitières, en particulier ceux associés à la  $\beta$ -lactoglobuline (Jost et al., 1987; Schmidt et Poll, 1991; Nakamura et al., 1993b; Visser et al., 1993; Ena et al., 1995). En effet, les peptides ne présentent pas les mêmes propriétés biologiques et immunologiques que les protéines natives et de façon générale, on reconnaît que les peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 2500 da ne sont pas immunogènes (Cordle, 1994).

### **3.5 L'amertume des hydrolysats enzymatiques de protéines**

Le principal désavantage de l'hydrolyse enzymatique des protéines est la possibilité de générer des peptides amers, lesquels sont responsables des défauts de saveur rencontrés dans certains produits additionnés d'hydrolysats protéiques (Ma et al., 1983; Adler-Nissen, 1986a; Pedersen, 1994; Yeom et al., 1994; Godfrey, 1996). Il est important de préciser que les peptides amers ne sont pas des produits secondaires de la réaction, mais des produits normaux issus de l'hydrolyse enzymatique des liens peptidiques d'une protéine (Adler-Nissen, 1986a). Bien que le mécanisme de formation de l'amertume ne soit toujours pas élucidé, de nombreux chercheurs ont démontré que l'amertume d'un peptide est dépendante de sa teneur en acides aminés hydrophobes (Matoba et Hata, 1972; Adler-Nissen, 1976; 1986; Yeom et al., 1994; Isawa et al., 1997a), surtout lorsque ces derniers sont situés près des extrémités N-terminales (Ishibashi et al., 1988) et C-terminales du

peptide (Ishibashi, 1987). En fait, plus le contenu en acides aminés hydrophobes d'une protéine est élevé, plus sa tendance à former des peptides amers est grande et ce, sans égard à sa séquence en acides aminés (Matoba et Hata, 1972).

Le Tableau 8 présente les valeurs d'hydrophobicité des acides aminés trouvés dans les protéines alimentaires. Dans une protéine globulaire intacte, la majorité des chaînes latérales hydrophobes des acides aminés sont masquées à l'intérieur de la structure protéique et par conséquent, ne peuvent entrer en contact avec les papilles gustatives. Par contre, l'hydrolyse d'une protéine mène à l'exposition des résidus hydrophobes qui peuvent alors interagir avec les papilles gustatives, d'où la perception d'une saveur amère (Adler-Nissen, 1984; Pedersen, 1994; Godfrey, 1996; Lovsin-Kukman et al., 1996).

De façon générale, les peptides amers contiennent entre 3 et 15 acides aminés et se distinguent par la présence d'acides aminés hydrophobes tels la leucine, l'isoleucine, la proline, la valine, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (Pawlett et Bruce, 1996). La majorité des acides aminés hydrophobes ayant un goût amer, les peptides formés par ces acides aminés sont également amers (Roudot-Algaron, 1996). Il a été démontré également que l'intensité de cette amertume était proportionnelle au nombre d'acides aminés hydrophobes présents dans le peptide, de même qu'à la taille des peptides. Sur la base de ces observations, Ney (1979) a mis au point la règle du «Q-value» afin de prédire la probabilité d'apparition de l'amertume dans un hydrolysate protéique. Cette règle utilise les valeurs calorifiques ( $\Delta f_i$ ) spécifiques à chacun des acides aminés (Tableau 8) pour calculer l'hydrophobicité globale d'un peptide. La valeur Q se définit comme la mesure de l'hydrophobicité des peptides et correspond à la moyenne des énergies libres de transfert ( $\Delta f_i$ ) de l'éthanol à l'eau, des acides aminés constituant le peptide (Adler-Nissen, 1986b). Elle se calcule à l'aide de l'équation suivante:

$$Q = \frac{\sum \Delta f_i}{n}$$

**Tableau 8:** Énergies libres de transfert (hydrophobicité) des chaînes carbonées des acides aminés présents dans les protéines alimentaires<sup>1</sup>.

<b>Acides aminés</b>	<b><math>\Delta f</math>-value à 25°C (cal/mole)</b>
Glutamine	-100
Asparagine	-10
Glycine	0
Cystéine/Cystine	0
Sérine	40
Thréonine	440
Histidine	500
Acide aspartique	540
Acide glutamique	550
Arginine	730
Alanine	730
Méthionine	1300
Lysine	1500
Valine	1690
Leucine	2420
Proline	2620
Phénylalanine	2650
Tyrosine	2870
Isoleucine	2970
Tryptophane	3000

<sup>1</sup> Tiré de Ney (1979).

où :

- $Q$  est l'hydrophobicité moyenne (calories/mole) du peptide
- $\Sigma\Delta f_i$  est la somme de l'hydrophobicité relative (calories/mole) des résidus d'acides aminés du peptide, mesuré à 25°C
- $n$  est le nombre de résidus d'acides aminés dans le peptide

Selon Ney (1979), les peptides amers ont une valeur d'hydrophobicité moyenne supérieure à 1400 calories par mole (5,86 kJ), alors que les peptides non amers ont une valeur inférieure à 1300 calories par mole (5,44 kJ). Cette théorie a toutefois été largement controversée, principalement en raison de la surestimation de l'amertume des peptides à partir de la valeur  $Q$  (Adler-Nissen, 1986b).

L'apparition d'amertume dans les hydrolysats enzymatiques de protéines a été étudiée par de nombreux auteurs (Ma et al., 1983; Adler-Nissen, 1986b; Visser et al., 1993; Yeom et al., 1994; Ge et Zhang, 1996; Lovsin-Kukman et al., 1996, Isawa et al., 1997a; 1997b; McDonnell et al., 1997). Ces travaux ont démontré, entre autres, que les caséines et les protéines de soya mènent très souvent à l'apparition d'amertume dans les produits issus de leur hydrolyse. De même, l'hydrolyse de la lactalbumine du lait donnera un produit au goût amer plus prononcé que celui obtenu par l'hydrolyse de l'ovalbumine de l'œuf et ce, en raison de son contenu élevé en acides aminés hydrophobes (Pedersen, 1994). Le Tableau 9 présente les niveaux d'hydrophobicité de certaines protéines alimentaires, de même qu'une appréciation de l'amertume des produits obtenus suite à leur hydrolyse. Il faut toutefois préciser qu'il est difficile de généraliser l'intensité de l'amertume dans les hydrolysats protéiques en raison de l'influence de la source enzymatique, utilisée pour la fabrication de l'hydrolysats, sur les caractéristiques sensorielles du produit final. En effet, on reconnaît généralement que les protéases spécifiques à l'hydrolyse des acides aminés hydrophobes limitent l'apparition d'amertume dans les hydrolysats protéiques (Godfrey, 1996).

Enfin, l'amertume d'un hydrolysats serait également liée au degré d'hydrolyse (DH) des protéines. À mesure que l'hydrolyse progresse, l'amertume d'un hydrolysats protéique augmente suivant l'exposition des acides aminés hydrophobes présents dans les peptides de

**Tableau 9:** Comparaison des niveaux d'hydrophobicité (%) de certaines protéines alimentaires et de l'amertume de leurs hydrolysats enzymatiques<sup>1</sup>.

Protéines	Hydrophobicité (%)		Amertume de l'hydrolysate
	Total	Ile+Phe +Pro+Trp	
<b>Blé (gluten)</b>	46.5	54	-
<b>Caséines</b>	57.0	42	+
<b>Gélatine</b>	46.5	75	-
<b>Lactosérum</b>	58.5	32	+
<b>Poisson</b>	47.7	32	-
<b>Soya</b>	41.4	40	+
<b>Viande</b>	44.0	33	-

<sup>1</sup> Godfrey (1996).



faibles poids moléculaires, d'où la perception d'une saveur amère de plus en plus intense. Par contre, à des valeurs de degré d'hydrolyse élevées, l'apparition de peptides de très petites tailles et d'acides aminés libres mène à une diminution de l'amertume. Selon Adler-Nissen (1984), les peptides hydrophobes sont significativement plus amers qu'un mélange des acides aminés libres correspondants. Par conséquent, afin de restreindre l'apparition de l'amertume dans les hydrolysats protéiques, il est important de limiter l'hydrolyse des protéines à des degrés d'hydrolyse faibles (<5%), ou de poursuivre la réaction jusqu'à des degrés d'hydrolyse très élevés (hydrolyse complète).

Gonzalez-Tello et al. (1994) ont étudié les profils de poids moléculaires d'hydrolysats de protéines du lactosérum en relation avec leur amertume. Ces auteurs ont démontré que la présence de peptides hydrophobes de faibles poids moléculaires (1000-6000 da) était responsable du goût amer de ces hydrolysats. Selon ces auteurs, pour éviter l'apparition d'amertume dans une boisson nutritionnelle de type formule entérale, l'hydrolysats doit contenir des peptides dont les poids moléculaires sont inférieurs à 1000 da. Par contre, Lovsin-Kukman (1996) ont observé que les peptides hydrophobes responsables de l'amertume dans des hydrolysats de protéines de soya, préparés à l'aide d'une protéase bactérienne (*Bacillus licheniformis*), avaient un poids moléculaire de moins de 1000 da.

### **3.6 Les méthodes de désamérisation des hydrolysats enzymatiques de protéines**

L'amertume des hydrolysats protéiques étant un paramètre critique pour leur utilisation dans les aliments, de nombreuses méthodes de désamérisation ont été étudiées. Ces méthodes incluent: 1) la séparation sélective, 2) le « masquage », 3) les méthodes chimiques, 4) la réaction de plastéine et 5) les méthodes enzymatiques.

**1) La séparation sélective** est obtenue soit à partir de charbon actif, de matrice hydrophobe ou encore, par une extraction au solvant (souvent avec le 2-butanol). Dans le cas du charbon actif, il agit à titre d'adsorbant hydrophobe et se lie donc aux peptides et aux acides aminés hydrophobes responsables de l'amertume (Pedersen, 1994). De façon générale, un traitement au charbon actif donne des résultats très satisfaisants mais il

implique une étape supplémentaire dans le procédé de fabrication d'un hydrolysats. (Ma et al., 1983; Adler-Nissen, 1984; 1986a). Ce type de traitement a été utilisé avec succès par Helbig et al (1980) et Ma et al. (1983) pour la désamérisation d'hydrolysats de protéines laitières destinés à la fortification protéique de jus de fruits et de boissons douces. Khanna et Gupta (1996) ont également observé une diminution significative de l'amertume d'un hydrolysats de caséines suite à son traitement sur charbon actif (15% p/v). Cependant, des pertes d'azote protéique de l'ordre de 41% ont été mesurées, dues essentiellement à l'adsorption sélective de certains acides aminés (TRP, PHE) par le charbon (Cogan et al., 1981); ce traitement peut donc affecter la qualité nutritionnelle d'un hydrolysats protéique. Enfin, Lin et al. (1997) ont démontré l'efficacité de la résine C<sub>18</sub> (octadécyl-siloxane) pour la désamérisation d'hydrolysats enzymatiques de caséines. Toutefois, comme l'utilisation du charbon actif, l'utilisation d'une résine hydrophobe amène une étape supplémentaire dans le procédé de fabrication d'un hydrolysats et surtout, la chromatographie est une méthode coûteuse et difficile à implanter en industrie alimentaire.

**2) Le « masquage ».** Certains composés ont été identifiés pour masquer la saveur amère des hydrolysats protéiques. Par exemple, l'addition de polyphosphates, de gélatine ou de glycine durant le procédé d'hydrolyse permet de masquer l'amertume des hydrolysats de caséines. Ce résultat est également obtenu avec la cyclodextrine en raison de sa capacité à masquer les groupements hydrophobes des peptides amers. Les acides glutamique et aspartique peuvent aussi être utilisés, mais ces derniers produisent une saveur acide dans le produit (Stanley 1981; Lemieux et Simard, 1991; Pedersen 1994). Le principal désavantage de la méthode du « camouflage » réside dans la nécessité d'utiliser des quantités importantes de ces composés ce qui peut affecter la qualité nutritionnelle et fonctionnelle du produit final.

**3) Les méthodes chimiques.** Pour réduire l'amertume des hydrolysats enzymatiques de protéines, Yeom et al. (1994) ont proposé l'acétylation de la lysine à l'aide du N-acetyl imidazole. Ce type de modification permet de réduire l'amertume des hydrolysats protéiques mais affecte toutefois la valeur nutritive du produit via une baisse de la disponibilité de la lysine.

**4) La réaction de plastéine.** Il s'agit d'une réaction enzymatique qui permet de lier les acides aminés et les peptides issus d'une protéine préalablement hydrolysée. Cette réaction mène à la formation d'une molécule de haut poids moléculaire, la plastéine, mais dont les propriétés sont différentes de celles de la protéine originale (Fox et al., 1982; Whitaker et Puigserver, 1982; Nakai et Li-Chan, 1989). La plastéine ainsi formée n'a plus aucune saveur particulière et cette réaction est très efficace pour réduire l'amertume des hydrolysats. Toutefois, sous certaines conditions, la réaction de plastéine peut conduire à la formation de substances toxiques ce qui limite son utilisation dans le domaine alimentaire (Pedersen, 1994; Lin et al., 1997).

**5) Les méthodes enzymatiques.** L'amertume étant liée de près à la présence d'acides aminés hydrophobes à l'extrémité des peptides, de nombreuses tentatives ont été réalisées afin de réduire l'amertume des hydrolysats par l'utilisation d'exopeptidases. Parmi ces enzymes, on regroupe les aminopeptidases spécifiques à l'hydrolyse des acides aminés en position N-terminale des chaînes peptidiques, de même que les carboxypeptidases dont l'hydrolyse est spécifique aux acides aminés en position C-terminale des peptides. Ces enzymes, inefficaces pour l'hydrolyse des protéines intactes, sont donc toujours utilisées après ou en combinaison avec une endoprotéase (Pawlett et Bruce, 1996).

Un résumé des résultats des travaux portant sur la désamérisation d'hydrolysats protéiques à l'aide d'exopeptidases est présenté au Tableau 10. La majorité de ces travaux ont étudiés la désamérisation d'hydrolysats de caséines laitières, ces derniers étant reconnus pour leur amertume prononcée. De façon générale, une diminution significative de l'amertume de ces hydrolysats protéiques a été obtenue mais la majorité des enzymes utilisées dans ces travaux ne sont pas disponibles sur le marché, ce qui limite leur intérêt pour des applications industrielles. Toutefois, plusieurs enzymes désamérisantes sont maintenant disponibles commercialement dont la Debitrase<sup>®</sup> DBP20 (Imperial Biotechnology), la Flavorpro<sup>™</sup> 192P (Biocatalysts), la Corolase<sup>™</sup> 7093 (Röhm Tech), la Flavourzyme<sup>™</sup> (Novo Nordisk) et l'Enzeco tannase (Enzyme Development Corporation). Il est donc possible,

Tableau 10: Travaux de la littérature portant sur la désamérisation d'hydrolysats protéiques à l'aide d'exopeptidases.

Exopeptidases	Disponibilité commerciale	Spécificité	Substrat protéique	Effet sur l'amertume	Références
Carboxypeptidase isolée du blé	Non	Acides aminés hydrophobes situés en position C-terminale	Hydrolysat pepsique de caséines	↓	Umetsu et al., 1983; Umetsu et Ichishima, 1988
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	Non	Acides aminés hydrophobes situés en position N-terminale	Hydrolysat de caséines laitières (dont le peptide $\alpha_1$ -CN Ø1-100)	↓	Minagawa et al., 1989
Subtilisin	Non	Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe	Hydrolysat de caséines laitières	↓	Minagawa et al., 1989
<i>Aspergillus oryzae</i>	Oui	Acides aminés aromatiques	Hydrolysat de caséines laitières	↓	Nakamura et al., 1993a
<i>Aspergillus oryzae</i>	Oui	Acides aminés hydrophobes	Hydrolysat de caséines $\alpha$	↓	Gallagher et al., 1994
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 948	Non	Val, Leu, Trp	Hydrolysat de protéines de lait UHT et peptides amers de synthèse	↓	Gobbetti et al., 1995
Chymotrypsine porcine immobilisées	Non	Arg, I,ys, His, Tyr, Phe, Leu, Glu	Hydrolysat pepsique et chymotrypsique de caséines	↓	Ge et Zhang, 1996
<i>Aeromonas caviae</i> T-64	Non	Acides aminés en position N-terminale ou adjacente, dont Leu, Tyr et Phe	Hydrolysat de caséines laitières et de protéines de soya	↓	Izawa et al., 1997a; 1997b
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. cremoris AM2	Non	Acides aminés en position N-terminale avec un résidu Pro à l'avant dernière position	Hydrolysat de caséines laitières	↓	McDonnell et al., 1997

actuellement, d'envisager la désamérisation des hydrolysats protéiques par voie enzymatique via l'utilisation d'exopeptidases commerciales.

#### 4. BUT, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Dans la revue de littérature, il a été démontré que le secteur des boissons non alcoolisées est actuellement le plus actif dans le domaine des aliments fonctionnels et des produits nutraceutiques. En effet, les boissons sont un vecteur bien adapté à l'ajout de composantes nutritives et sont fort appréciées par les consommateurs en raison de leur variété et de la facilité à les ajouter à l'alimentation. Parmi ces boissons, celles fortifiées en protéines visent un objectif nutritionnel et sont destinées à une clientèle dont les besoins en protéines sont élevés. La mise au point d'un jus de fruits enrichi en protéines du lactosérum permettrait donc la mise en marché d'une nouvelle boisson «nutraceutique» à fort potentiel commercial, destinée principalement aux personnes âgées, aux individus sous régime amaigrissant et aux sportifs. À l'heure actuelle, l'utilisation des protéines du lactosérum dans les jus de fruits est toutefois limitée par des problèmes technologiques liés à leur faible solubilité à forte concentration dans les milieux acides, de même qu'à leur instabilité thermique lors des traitements de pasteurisation appliqués aux jus de fruits.

D'autre part, il est reconnu que l'hydrolyse enzymatique, réalisée dans des conditions contrôlées, permet d'améliorer la solubilité des protéines du lactosérum et leur stabilité thermique. Ce traitement permet aussi d'améliorer la digestibilité des protéines et peut mener à la libération de peptides (<5000 da) dont l'assimilation par l'organisme est plus rapide. Le but de ce projet de recherche était donc ***la mise au point d'un hydrolysat enzymatique de protéines du lactosérum destiné à la fortification protéique d'un jus de fruits et ce, en vue de la fabrication d'une boisson «nutraceutique».***

Les hypothèses et les objectifs de ce projet ont été définis à la lumière des résultats obtenus dans le cadre de travaux antérieurs, réalisés au cours du projet de maîtrise de Martin Rolland. Dans ces travaux, deux hydrolysats enzymatiques de protéines du lactosérum destinés à la fortification protéique d'un jus d'orange ont été mis au point à

l'aide des enzymes Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II et Alcalase. Les conditions optimales d'hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum pour l'obtention de ces hydrolysats ont été sélectionnées selon les deux critères suivants: 1) la production d'une teneur élevée (>50%) en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da), reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme et 2) l'amélioration de la solubilité de ces protéines dans un jus d'orange suivant l'application d'un traitement thermique sévère (100°C/7 min). Les résultats de ces travaux ont permis de démontrer que l'utilisation des enzymes Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II et Alcalase permettait d'obtenir des hydrolysats protéiques riches en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da), dont les teneurs étaient respectivement de 55% et 93%. De plus, additionnés à un jus d'orange selon une cote protéique de 20, ces deux ingrédients protéiques demeuraient solubles à plus de 70% suivant l'application d'un traitement thermique sévère (100°C/7 min). Par contre, l'hydrolysat obtenu à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II conférait au jus d'orange une coloration blanchâtre inacceptable, avec l'apparition d'un dépôt dans le produit en cours d'entreposage; la solubilité (~70%) de cet hydrolysat protéique dans le jus d'orange était donc insuffisante pour envisager la fabrication d'un jus fortifié (cote protéique de 20) en protéines hydrolysées. Dans le cas de l'hydrolysat préparé avec l'Alcalase, le principal problème observé avec cet ingrédient était l'amertume très prononcée qu'il conférait au jus d'orange. C'est donc en vue de résoudre les problèmes rencontrés avec ces deux hydrolysats enzymatiques que les hypothèses suivantes ont été définies:

***L'utilisation de l'ultrafiltration, en remplacement du traitement thermique d'inactivation des enzymes, permettra d'améliorer la solubilité et la stabilité thermique des hydrolysats protéiques dans un jus de fruits suivant sa pasteurisation (86°C/17 sec), tout en augmentant leur teneur en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da).***

***L'ajout d'une exopeptidase pour l'hydrolyse des protéines du lactosérum à l'aide de l'Alcalase permettra de diminuer l'amertume de cet hydrolysats protéique.***

Afin de vérifier ces hypothèses et rencontrer le but de ce projet de recherche, les objectifs suivants ont été définis:

- 1) Évaluer l'effet de l'ultrafiltration, utilisée pour stopper la réaction d'hydrolyse, sur le profil peptidique des hydrolysats de protéines du lactosérum et les caractéristiques physico-chimiques (solubilité, turbidité, viscosité et stabilité thermique) de jus d'orange additionnés de ces hydrolysats.***
  
- 2) Évaluer l'efficacité d'un traitement enzymatique, à l'aide d'une exopeptidase, pour la désamérisation d'un hydrolysats de protéines du lactosérum préparé à l'aide de l'Alcalase.***

Le prochain chapitre du mémoire (chapitre II) est consacré à la présentation des expérimentations réalisées et des résultats obtenus dans le cadre de ce projet de recherche. Pour accélérer la publication des travaux, ce chapitre a été rédigé sous la forme d'un article scientifique. Le mémoire se termine par une conclusion générale où sont résumés les principaux résultats obtenus dans le cadre de ce travail et où sont exposées des perspectives d'avenir dans ce domaine de recherche. Il est à noter que les références citées dans le chapitre II se retrouvent dans la section «Bibliographie générale», présentée à la toute fin du mémoire.

## **CHAPITRE II**

### **AMÉLIORATION DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET ORGANOLEPTIQUES D'HYDROLYSATS ENZYMATIQUES DE PROTÉINES DU LACTOSÉRUM DESTINÉS À LA FORTIFICATION PROTÉIQUE D'UN JUS D'ORANGE**



## 1. RÉSUMÉ

Le but de cette étude était la mise au point d'hydrolysats enzymatiques de protéines du lactosérum destinés à la fortification protéique d'un jus d'orange. L'hydrolyse d'un isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) a donc été réalisée à l'aide de l'enzyme Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II ou d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme. Les réactions d'hydrolyse ont été stoppées par ultrafiltration pour la séparation physique des enzymes, mais également pour enrichir les hydrolysats en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da), reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme. Les résultats de cette étude ont démontré que l'utilisation de ces enzymes permet d'obtenir des ingrédients hydrolysés qui présentent de nombreux avantages nutritionnels pour la fortification protéique des jus de fruits. En effet, ces hydrolysats sont riches en protéines (86-89%) de bonne qualité nutritive (CEP~3.2), pauvres (<1%) en lactose et en matière grasse, contiennent une teneur en cendres acceptable (5-9%) et une forte proportion (75-90%) de peptides de faibles poids moléculaires. De plus, additionnés à un jus d'orange selon une cote protéique de 20, les hydrolysats protéiques ultrafiltrés présentent une solubilité de près de 100% suivant l'application d'un traitement de pasteurisation (86°C/17 sec), alors que la solubilité de ces hydrolysats protéiques préparés dans les mêmes conditions mais désactivés par traitement thermique est inférieure à 86%. Enfin, il a été démontré que l'ajout de Flavourzyme lors de l'hydrolyse des protéines du lactosérum à l'aide de l'Alcalase permet de réduire, de façon significative ( $p < 0.05$ ), l'amertume de cet hydrolysat.

## 2. INTRODUCTION

Les aliments fonctionnels et les produits nutraceutiques se définissent comme des aliments ou des ingrédients qui possèdent à la fois de bonnes propriétés nutritionnelles et des effets bénéfiques pour la santé des individus (Stephen, 1998). En raison de leur image positive, ces produits suscitent un intérêt marqué chez le consommateur (Paquin et Gauthier, 1995; Hilliam, 1998). À l'heure actuelle le marché des aliments fonctionnels et des produits nutraceutiques est en pleine croissance et d'ici 10 ans on prévoit qu'il pourrait atteindre 500 milliards de dollars US (Paquin et Gauthier, 1995). Dans ce domaine, le secteur des boissons non alcoolisées est le plus actif (Paquin et Gauthier, 1995). Parmi ces boissons, celles fortifiées en protéines visent un objectif nutritionnel et sont destinées à une clientèle dont les besoins en protéines sont élevés tels les sportifs, les personnes âgées ou les individus sous régime amaigrissant (Burn, 1995). Pour l'industrie laitière, la fortification protéique des boissons représente donc une voie de valorisation intéressante pour le lactosérum de fromagerie.

À ce jour, le lactosérum a été exploité à des fins nutritives dans les boissons alcoolisées comme le vin ou la bière, de même que dans les boissons sans alcool comme les jus aromatisés ou les boissons au yogourt (Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992). Dans ces boissons, le lactosérum est ajouté sous différentes formes selon les traitements appliqués au produit: lactosérum brute, déminéralisé ou déprotéiné, concentrés de protéines ou ingrédients hydrolysés (Jelen et al., 1987; Sienkiewicz et Riedel, 1990; Jelen, 1992). En raison de l'instabilité des protéines du lactosérum lors des traitements thermiques, l'ajout de concentrés protéiques dans les boissons à des concentrations supérieures à 3% conduit cependant à la formation de précipités dans les produits (de Wit, 1989b). Au Canada, pour la préparation d'un jus fortifié en protéines il faut atteindre une cote protéique de 20, ce qui représente l'ajout de 6.25 g de protéines de bonne qualité nutritive (CEP-3.2) dans une portion de jus de 175 ml et ce, en autant que la teneur en protéines de l'ingrédient protéique soit supérieure à 90%. Dans un jus de fruits, une concentration en protéines aussi élevée (~4%) peut donc mener à des problèmes de solubilité de ces protéines surtout après le traitement de pasteurisation appliqué à ce type de produit.

Afin de résoudre les problèmes d'instabilité à la chaleur des protéines du lactosérum, l'hydrolyse enzymatique a été proposée (Haque, 1993; Frøkjær, 1994; Mahmoud, 1994). Du point de vue nutritionnel, l'hydrolyse enzymatique permet d'améliorer la digestibilité et/ou l'absorption gastro-intestinale des protéines (Cordle, 1994; Gonzalez-Tello et al., 1994; Swartz, 1995) via la libération de peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da), reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme (Ziegler et al., 1990; Adachi et al., 1991; Motion, 1992; Grasset et Boverto, 1993; Frøkjær, 1994). Par contre, l'hydrolyse enzymatique des protéines peut mener à la formation de peptides amers, lesquels sont responsables des défauts de saveur rencontrés dans certains produits additionnés d'hydrolysats protéiques (Ma et al., 1983; Adler-Nissen, 1986a; Pedersen, 1994; Yeom et al., 1994). Puisque les acides aminés hydrophobes situés aux extrémités d'une chaîne peptidique seraient responsables de l'amertume d'un peptide (Matoba et Hata, 1972; Adler-Nissen, 1976; Ishibashi et al., 1987; 1988; Isawa et al., 1997a), de nombreux travaux ont suggéré l'utilisation d'exopeptidases afin de réduire l'amertume des hydrolysats protéiques (Umetsu et al., 1983; Umetsu et Ichishima, 1988; Minagawa et al., 1989; Nakamura et al., 1993a; 1993b; Gobetti et al., 1995; Ge et Zhang, 1996; Izawa et al., 1997a; 1997b; McDonnell et al., 1997).

Dans le cadre de travaux antérieurs (Rolland, 1999), deux hydrolysats de protéines du lactosérum destinés à la fortification protéique d'un jus d'orange ont été préparés à l'aide de deux enzymes d'origine bactérienne, soit l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (*Bacillus subtilis*) et l'Alcalase (*Bacillus licheniformis*). Ces ingrédients protéiques étaient riches (>65%) en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da) et demeuraient solubles à plus de 70% dans un jus d'orange (cote protéique de 20) suivant l'application d'un traitement thermique sévère (100°C/7 min). Par contre, les résultats de ces travaux ont révélé certains problèmes, notamment au niveau de l'apparence et de la saveur des jus fortifiés en ces hydrolysats. En effet, les jus additionnés de l'hydrolysat préparé avec l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II présentaient une coloration blanchâtre inacceptable alors que ceux enrichis avec l'hydrolysat préparé à partir de l'Alcalase offraient une saveur amère très prononcée.

Le but de la présente étude était donc de mettre au point un hydrolysât enzymatique de protéines du lactosérum destiné à la fortification protéique d'un jus d'orange qui soit facilement assimilable par l'organisme, qui résiste au traitement de pasteurisation du jus et qui offre des qualités organoleptiques acceptables et ce, en vue de la préparation d'une boisson «nutraceutique».

### 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 3.1 Matériel

L'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>, 93.6 % p/p protéine) a été obtenu de la compagnie Davisco Foods International Inc. (Le Sueur, Mn). La protéase Enzeco<sup>®</sup> neutral bacterial II, une préparation enzymatique commerciale issue de *Bacillus subtilis*, provenait de la compagnie EDC (New-York, NY). L'Alcalase 2.4 L et la Flavourzyme, dérivées respectivement de *Bacillus licheniformis* et de *Aspergillus oryzae*, ainsi que la Chymotrypsine (pancréas de boeuf, type 800S) ont été obtenues chez Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Denmark). La Debitrase DBP20, extraite de *Lactococcus lactis* et de *Aspergillus oryzae*, provenait de la compagnie Imperial Biotechnology (St.Louis, MO). L'hémoglobine, les immunoglobulines (150 000 Da), l' $\alpha$ -lactalbumine (14 000 Da), la  $\beta$ -lactoglobuline (36 000 Da, dimère), l'insuline A (2 531.6 Da), le kentsin (500.6 Da) et le N-formyl-MET-ALA (248.3 Da) ont été obtenus de la compagnie Sigma Chemicals (St.Louis, MO). L'albumine (67 000 Da), l'ovalbumine (43 000 Da), le chymotrypsinogen A (25 000 Da) et la ribonucléase A (13 700 Da) provenaient de la compagnie Pharmacia (Bromma, Suède). Le jus d'orange sans pulpe utilisé dans cette étude était de marque OASIS<sup>™</sup> (A. Lassonde Inc., Québec, Canada); il a été acheté dans un supermarché local. Tous les autres réactifs étaient de grade analytique.

#### 3.2 Dosage de l'activité enzymatique spécifique des enzymes

L'activité enzymatique spécifique des enzymes a été déterminée selon une modification de la méthode de Anson et Mirsky (1932), utilisant l'hémoglobine à titre de substrat protéique. Une solution d'hémoglobine a été préparée dans un tampon TRIS 0,2 M (pH 7,4), à une concentration de 2,5% (p/v) pour l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II et de 3,5% (p/v) pour l'Alcalase et la Flavourzyme. Dans des tubes maintenus à 37°C, 5 ml de la solution d'hémoglobine ont été ajoutés, suivi de l'addition de 1 ml de solution enzymatique. Ces solutions enzymatiques ont été préparées dans l'eau déionisée à des concentrations variant

de 0,1 à 0,5% pour l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II et pour la Flavourzyme. Dans le cas de l'Alcalase, déjà à l'état liquide, des volumes variant de 0,1 à 0,8 µl de la préparation enzymatique ont été ajoutés à la solution d'hémoglobine. Après 5 minutes de réaction pour l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II et l'Alcalase, et 15 minutes pour la Flavourzyme, 10 ml d'une solution de TCA (10% p/v) ont été ajoutés aux tubes afin de stopper la réaction enzymatique. Après l'agitation des tubes (vortex), les solutions ont été filtrées sur papier Whatman #1 et l'absorbance des filtrats a été mesurée à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre 8451A Diode Array de Hewlett-Packard (Palo Alto, CA). Les valeurs d'activité enzymatique spécifique mesurées pour l'Enzeco<sup>®</sup> neutral bacterial protease II, l'Alcalase et la Flavourzyme ont été calculées à 64, 557 et 58 unités par mg de protéines, respectivement; avec cette méthode, une unité d'enzyme correspond à une variation de la densité optique à 280 nm de 0,001 par minute.

### **3.3 Mise au point des conditions d'hydrolyse enzymatique de l'isolat de protéines du lactosérum**

#### ***Sélection d'une enzyme désamérisante***

Pour la désamérisation enzymatique de l'hydrolysate préparé à l'aide de l'Alcalase, l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) a été hydrolysé en combinant l'Alcalase à la Flavourzyme, à la Debitrase DBP20 ou à la chymotrypsine. Ces hydrolyses ont été réalisées dans des béchers d'une capacité de 800 ml, muni d'un contrôle de l'agitation (tige à pales) et de la température (bain-marie). En cours d'hydrolyse, le pH du milieu a été maintenu à 8,0 par l'ajout manuel d'un mélange de base (NaOH/KOH 1 N; ratio 1:2) et ce, jusqu'à un degré d'hydrolyse (DH) de 4% mesuré par la méthode pH-stat (Adler-Nissen, 1977). Par la suite et jusqu'à la fin de la réaction, le degré d'hydrolyse des protéines a été mesuré par osmométrie à l'aide d'un osmomètre (modèle 3300) de la compagnie Advanced Instruments (Norwood, MA). Les conditions d'hydrolyse utilisées pour ces essais ont été les suivantes: solution protéique à 18,7% (p/p); volume réactionnel de 500 ml; température de  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ; agitation à 100 rpm. L'hydrolyse du Bipro<sup>®</sup> a été réalisée avec un ratio

enzyme:substrat (ml enzyme:g protéine) de 1:25 pour l'Alcalase, combinée à des ratios enzyme:substrat (g enzyme:g protéine) de 1:25, 1:50 et 1:200 pour les enzymes Flavourzyme, Debitrase DBP20 et Chymotrypsine, respectivement. Ces trois enzymes, à l'état poudre, ont d'abord été solubilisées dans l'eau distillée (Flavourzyme, Debitrase DBP20) ou dans du HCl 0,001N (chymotrypsine) à une concentration de 6 à 12.5% (p/v) et ce, afin de faciliter leur addition au mélange réactionnel. Selon la tendance à la gélification des hydrolysats en cours de réaction, les hydrolyses ont été stoppées par l'application d'un traitement thermique (75°C/10 min.) après 223, 250 et 300 minutes pour les enzymes Flavourzyme, Debitrase DBP20 et chymotrypsine, respectivement

### ***Sélection des conditions de désactivation des enzymes en fin de réaction***

Afin de déterminer les conditions (T°, durée) du traitement thermique assurant l'inactivation complète des enzymes Alcalase et Flavourzyme à la fin de la réaction d'hydrolyse, l'isolat de protéines du lactosérum a été hydrolysé dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Toutefois, les réactions ont été stoppées après 30 minutes, puis le pH des milieux réactionnels a été ajusté à 6,5 à l'aide d'une solution d'acide citrique (25%). L'inactivation thermique des enzymes a alors été réalisée dans une des conditions suivantes: 85°C/5 min, 75°C/10 min, 65°C/15 min et 55°C/20 min. Les solutions protéiques désactivées ont ensuite été séparées en deux volumes égaux. Une portion du mélange (T30) a rapidement été refroidi alors que la deuxième portion a été ajustée au pH initial de la réaction (8,0), puis placée à nouveau dans le bain-marie pour une durée d'hydrolyse additionnelle de 60 minutes (T30+60). Les deux portions du mélange ont été analysées pour leur teneur en protéines par la méthode Kjeldahl et leur ratio AN/TN.

### 3.4 Préparation finale des hydrolysats enzymatiques

#### *Hydrolysats obtenu à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> neutral bacterial protease II*

L'hydrolyse enzymatique de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) par la protéase Enzeco<sup>®</sup> neutral bacterial II a été réalisé dans un fermenteur New-Brunswick (Edison, NJ) d'une capacité de 20 L, muni d'un contrôle automatique de la température (bain-marie) et de l'agitation (tige à palmes). En cours d'hydrolyse, le pH (8,0) du mélange réactionnel a été maintenu constant par l'addition manuelle d'un mélange NaOH/KOH 2N (ratio 1:2) jusqu'à un degré d'hydrolyse de 4%, mesuré par la méthode pH-stat (Adler-Nissen, 1977). Par la suite et jusqu'à la fin de l'hydrolyse, l'évolution de la réaction a été suivie à l'aide d'un osmomètre Advanced Instruments (modèle 3300). Les conditions d'hydrolyse utilisées pour cet essai ont été les suivantes: solution protéique à 18,7% (p/p); volume réactionnel de 14 L; température de  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ; agitation à 200 rpm; ratio enzyme:substrat de 1:25 (g enzyme:g protéine); solution enzymatique à 12% (p/v) préparée dans du HCl 0.001 N. Après 150 minutes de réaction, un échantillon (500 ml) a été prélevé et désactivé thermiquement ( $75^\circ\text{C}/10$  min.). La réaction a ensuite été stoppée par l'élimination de l'enzyme du milieu réactionnel à l'aide d'un système d'ultrafiltration Amicon modèle DC10L #315 (Danvers, MA), équipé de membranes de type fibres creuses (Romicon 4PX3 710S) et possédant un seuil d'exclusion moléculaire de 30 kDa (Romicon Inc., Woburn, MA). Afin de minimiser les pertes en protéines, le mélange a été diafiltré par l'ajout de 16 L d'eau distillée, à raison de 4 L à la fois. Le perméat a été recueilli, congelé puis lyophilisé alors que le rétentat a subi un traitement thermique de désactivation des enzymes ( $75^\circ\text{C}/10$  min.) avant sa congélation et sa lyophilisation.

#### *Hydrolysats obtenu à l'aide d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme*

L'hydrolyse de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) à l'aide des enzymes Alcalase et Flavourzyme a été réalisée dans un bioréacteur (Bio-Expert, Qc) d'une capacité de 8 L,



muni d'un contrôle automatique de la température (paroi chauffante) et de l'agitation (tige à palmes). En cours d'hydrolyse, le pH réactionnel a été maintenu à 8,0 par l'ajout manuel d'un mélange de NaOH/KOH 2 N (ratio 1:2) jusqu'à une valeur DH de 4%, mesurée par la méthode pH-stat (Adler-Nissen, 1977). Par la suite et jusqu'à la fin de l'hydrolyse, l'osmométrie a été utilisée pour suivre l'évolution de la réaction. Les conditions d'hydrolyse utilisées pour cet essais ont été les suivantes: solution protéique à 18,7% (p/p); volume réactionnel de 6 L; température de  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ; agitation à 100 rpm; ratio enzyme:substrat de 1:25 (ml enzyme:g protéine) pour l'Alcalase et de 1:25 (g enzyme:g protéine) pour la Flavourzyme (solution à 16% p/v préparée dans l'eau distillée). Après 180 minutes de réaction, un échantillon (500 ml) a été prélevé et désactivé thermiquement ( $75^\circ\text{C}/10$  min.) alors que le reste du mélange a été ultrafiltré afin de stopper la réaction par la séparation physique des enzymes. Afin de réduire les risques de gélification en cours d'ultrafiltration et minimiser les pertes en protéines, le volume restant de l'hydrolysats a été dilué avec 12 kg d'eau distillée ( $50^\circ\text{C}$ ) avant d'être ultrafiltré à l'aide du système Amicon décrit précédemment. Le perméat a été recueilli, congelé puis séché par lyophilisation alors que le rétentat a d'abord été désactivé thermiquement ( $75^\circ\text{C}/10$  min.) avant sa congélation et sa lyophilisation.

### **3.5 Caractérisation de l'isolat de protéines du lactosérum et des hydrolysats protéiques**

#### ***Mesure du degré d'hydrolyse des protéines par la méthode pH-stat***

La cinétique d'hydrolyse des protéines a été mesurée par la méthode pH-stat (Adler-Nissen, 1977), qui consiste à mesurer la quantité de base nécessaire pour maintenir constant le pH du milieu réactionnel en cours de réaction. Avec cette méthode, le degré d'hydrolyse (DH) de la protéine est calculé à partir de l'équation suivante:

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

$$\text{où } h = B \times N_b \times 1/\alpha \times 1/MP$$

où: h est le nombre de liens peptidiques coupés;  $h_{\text{tot}}$  est le nombre total de liens peptidiques dans le substrat (8 meq/kg pour les protéines du lactosérum); B est la consommation de base (ml);  $N_b$  est la normalité de la base utilisée;  $\alpha$  est le degré de dissociation des groupements aminés ( $1/\alpha=1,2$  pour les protéines laitières) et MP représente la masse de protéines (g).

### ***Mesure du degré d'hydrolyse des protéines par osmométrie***

La mesure du degré d'hydrolyse des protéines a également été réalisée par osmométrie, une méthode basée sur la baisse du point de congélation d'une solution protéique suivant l'hydrolyse des protéines et la libération de molécules additionnelles dans le milieu. Avec cette méthode, le calcul du degré d'hydrolyse s'effectue à l'aide de l'équation suivante:

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

où:  $\Delta C$  est la baisse du point de congélation (mosmol); P est la concentration en protéines du milieu (g/1000 ml H<sub>2</sub>O);  $1/\omega$  est le facteur de calibration de l'osmomètre (égal à 1,04) et  $h_{\text{tot}}$  est le nombre total de liens peptiques dans le substrat (8 meq/kg pour les protéines du lactosérum).

### ***Mesure du ratio AN/TN***

Le ratio AN/TN représente la teneur en azote  $\alpha$ -aminé (AN) d'un échantillon, déterminée par une titration à l'acide formique, divisée par sa teneur en azote total, mesurée par la méthode Kjeldahl, et exprimé en pourcentage. Le ratio AN/TN est calculé à partir de l'équation suivante:

$$\frac{AN}{TN} (\%) = \frac{\text{teneur en azote } \alpha\text{-aminé}}{\text{teneur en azote total}} \times 100$$

### ***Analyses chimiques***

Le contenu en protéines ( $N \times 6.38$ ) de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a été déterminé en duplicata par la méthode Kjeldahl (FIL 20B, 1993) à l'aide d'un appareil à digestion Büchi 430 et d'une unité de distillation Büchi 323 (Brikmann Instruments, MT). La teneur en lactose a été évaluée en duplicata par la méthode enzymatique lactose/D-glucose (UV method, Boehringer Mannheim, Germany) (FIL 79A, 1989), utilisant un spectrophotomètre 8451A Diode Array de Hewlett Packard (Palo Alto, CA). La teneur en lipides a été obtenue en triplicata par une extraction à l'éther avec un appareil de type Mojonnier (FIL 1C, 1987). Les teneurs en solides totaux et en cendres ont été déterminées en duplicata selon la méthode 927.05,930.30 de l'AOAC (1990), basée sur le chauffage de l'échantillon dans un four à vide jusqu'à l'obtention d'un poids constant, suivi de l'incinération de l'échantillon.

### ***Dosage des minéraux par électrophorèse capillaire***

Le dosage des minéraux de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a été réalisé à l'aide d'un système d'électrophorèse capillaire à haute performance modèle <sup>3D</sup>CE de la compagnie Hewlett Packard (Waldbronn, Germany). Ce système était contrôlé à l'aide du logiciel HPChemStation de Hewlett Packard (Wilmington, DE) permettant l'acquisition et le traitement des données. Un capillaire de silice fondue d'une longueur de 72 cm et d'un diamètre intérieur de 50  $\mu\text{m}$  a été utilisé pour ces analyses. L'injection des échantillons a été réalisée dans les conditions suivantes: 23°C, mode hydrodynamique, pression de 50 mbar, durée de 4 secondes, courant de 30 mV. La longueur d'onde de détection utilisée pour l'analyse des cations (calcium, magnésium, sodium et potassium) était de 340 nm et celle des anions (phosphate, citrate, chlorure et sulfate) était de 350 nm. Les standards utilisés pour cette méthode étaient les suivants: NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, CaCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> et Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La phase mobile utilisée pour le dosage des anions était constituée d'un tampon IonPhor Anion PMA, provenant de la compagnie Dionex Corporation (Sunnyvale, CA), alors qu'un tampon composé de

sulfate de cuivre (4 mM), de 18 Crown-6 et d'acide formique (4 mM) a été utilisé pour la séparation des cations.

### ***Mesure du profil de poids moléculaires des composantes protéiques par HPSEC***

Le profil de distribution du poids moléculaire des composantes protéiques de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a été déterminé par chromatographie d'exclusion moléculaire à haute performance (HPSEC). Le système chromatographique utilisé pour cette analyse provenait de la compagnie Waters (Milford, MA) et comprenait un système de pompes (modèle 126P), un détecteur UV/VIS à longueurs d'onde variables (modèle 486) et un injecteur manuel Rheodyne (modèle 7725i, Cotati, CA). La séparation a été obtenue à l'aide d'une colonne BIOSEP SEC-S2000 (7.8 i.d. × 300 mm) de la compagnie Phenomenex (Torrance, CA), munie d'une pré-colonne BIOSEP S2000 GRD (7.8 i.d. × 75 mm) de la même compagnie. Les standards de protéines et de peptides utilisés pour le calibrage de la méthode étaient les suivants: immunoglobulines (150 000 Da), albumine (67 000 Da), ovalbumine (43 000 Da),  $\beta$ -lactoglobuline (36 000 Da, dimère), chymotrypsinogen A (25 000 Da), ribonucléase A (13 700 Da),  $\alpha$ -lactalbumine (14 000 Da), insuline A (2 531.6 Da), kentsin (500.6 Da), N-formyl-MET-ALA (248.3 Da). L'élution a été faite en mode isocratique à un débit de 1 ml/min et à température pièce. La phase mobile était constituée d'un tampon phosphate de sodium (0.1M, pH 6.8). Les échantillons ont été solubilisés dans la phase mobile à une concentration de 0.8% (p/v) sur une base protéique, puis filtrés sur une membrane de 0.22  $\mu$ m (PVDF, Gelman) avant leur injection dans la colonne. La détection a été effectuée à 214 nm et les données ont été recueillies et traitées à l'aide du logiciel chromatographique Gold<sup>®</sup> Nouveau de Beckman (Mississauga, Canada). Les profils de poids moléculaire ont été obtenus suite à l'intégration des chromatogrammes. La surface totale de ceux-ci a été séparée en quatre zones (>10 000, 10 000-5000, 5000-2000 et <2000 Da) et chaque zone a été exprimée en pourcentage de la surface totale.

### 3.6 Caractérisation des jus d'orange additionnés de l'isolat de protéines du lactosérum et des hydrolysats protéiques

#### *Mesure de la solubilité*

L'indice de solubilité de l'azote (NSI) de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a été évalué selon la méthode NSI standard (OACS, Official methods BA 11-65, 1985). Des dispersions protéiques (1% p/v, base protéique) ont été préparées dans l'eau distillée, puis le pH des solutions a été ajusté à 7,0 à l'aide de HCl ou de NaOH 0,1 N. Les dispersions ont ensuite été agitées pendant 120 minutes, puis un échantillon a été prélevé pour le dosage de l'azote totale (NT) par la méthode Kjeldahl (FIL 20B, 1993). Les dispersions ont été centrifugées à 3000 g pendant 10 minutes à 22 ± 2°C, les surnageants ont été filtrés sur papier Whatman #1, puis les filtrats ont été analysés pour leur teneur en azote soluble (NS) par la méthode Kjeldahl. La valeur NSI a été calculée à l'aide de l'équation suivante:

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

La solubilité de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a également été évaluée dans une solution modèle et dans un jus d'orange suivant certaines modifications au protocole expérimental. La solution modèle, reproduisant les conditions physico-chimiques d'un jus d'orange, a été préparée selon les directives de la compagnie A. Lassonde Inc. (Québec, Canada) et dans les conditions suivantes: eau distillée additionnée de 9.2% de sucre inverti, 4.8% d'une solution de pectine (2% p/v) et 0.5% d'acide citrique (50% p/v). L'isolat de protéines du lactosérum et les hydrolysats protéiques ont donc été solubilisés dans cette solution modèle (pH 2.6) ou dans le jus d'orange (pH 3.8) à une concentration de 1% (p/v, base protéique), mais sans ajustement du pH à 7,0. Les dispersions protéiques ont ensuite été traitées comme décrit précédemment pour la méthode NSI standard.

### ***Mesure de la turbidité***

La turbidité de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a été mesurée dans la solution modèle selon quatre cotes protéiques: 16, 20, 24 et 28. La cote protéique est définie comme la quantité de protéines (g) ajoutée à une portion de jus de 175 ml multipliée par le Coefficient d'Efficacité Protéique (CEP) de la protéine; dans le cas des protéines du lactosérum, le CEP est égal à 3.2 (Dibley, 1997). Les solutions protéiques ont été agitées pendant 30 minutes, puis des mesures de transmittance ont été effectuées à une longueur d'onde de 610 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Diode Array (modèle 8451A) de la compagnie Hewlett Packard (Palo Alto, CA).

### ***Mesure de la viscosité***

La viscosité de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a été mesurée dans la solution modèle et dans le jus d'orange selon les quatre cotes protéiques à l'étude: 16, 20, 24 et 28. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un viscosimètre Brookfield model DV-II+ (Stoughton, MA) muni d'une tige LV1. Les solutions protéiques ont été maintenues sous agitation durant 30 minutes à 4°C avant la mesure de la viscosité; les lectures ont été effectuées après 60 secondes de rotation (100 rpm).

### ***Mesure de la stabilité thermique***

La stabilité thermique de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a été évaluée dans la solution modèle et dans le jus d'orange selon les quatre cotes protéiques à l'étude: 16, 20, 24 et 28. Les solutions protéiques (100 ml) ont été placées dans des bouteilles de verre (250 ml), lesquelles ont été immergées dans l'eau bouillante (100°C) durant 7 minutes. Par la suite, l'indice de solubilité de l'azote a été déterminé sur les solutions protéiques selon la méthode NSI modifiée (sans ajustement du pH à 7,0) et ce, afin d'évaluer la perte de solubilité des protéines suite au traitement thermique.

La stabilité thermique des hydrolysats protéiques a également été évaluée avec la méthode NSI modifiée suivant une pasteurisation ( $86 \pm 2^\circ\text{C}/17$  secondes) du jus d'orange additionné de chacun des hydrolysats selon une cote protéique de 20. Le traitement de pasteurisation des jus fortifiés en protéines a été réalisé à l'aide d'un pasteurisateur à plaques (type P20-HB, No 2235-1910) de la compagnie Alfa-Laval (Suède).

### 3.7 Évaluation sensorielle de l'amertume

Afin d'évaluer l'efficacité de la Flavourzyme à désamériser l'hydrolysate préparé à l'aide de l'Alcalase, une évaluation sensorielle de l'amertume a été réalisée. Ainsi, l'amertume des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Alcalase et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme a été évaluée à l'aide d'un test de comparaison par paire. Pour ce test, un panel de 27 juges a été sélectionné sur la base de leur habileté à détecter les différences d'amertume lors d'un test de classement par rang, utilisant différentes concentrations de l'hydrolysate Alcalase. L'évaluation sensorielle a eu lieu au Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments de Saint-Hyacinthe (Québec, Canada), dans des cubicules individuels sous lumière rouge. Pour les besoins du test, les deux hydrolysats protéiques ont été solubilisés dans l'eau distillée (1% p/v) et des échantillons de 15 ml ont été présentés aux juges suivant la randomisation préétablie. Les juges devaient rincer leur bouche avec de l'eau potable avant la dégustation, de même qu'entre chaque échantillon, et devaient indiquer lequel des deux échantillons présentés accusait la plus forte intensité de saveur amère. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel *Compusense 5* de la compagnie Compusense (Ontario, Canada), en utilisant un niveau de probabilité du test ( $\alpha$ ) de 0.05 et ce, pour établir une différence significative entre les deux hydrolysats protéiques.

#### 4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans le cadre de travaux antérieurs (Rolland, 1999), deux hydrolysats enzymatiques de protéines du lactosérum ont été mis au point pour la fortification protéique d'un jus d'orange. Les résultats de cette étude ont démontré que l'hydrolyse d'un isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) à l'aide des enzymes Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II et Alcalase permettait d'obtenir des ingrédients protéiques fortement hydrolysés (AN/TN, 17-23%), riches en protéines (88-93%), avec une teneur en cendres acceptable (~4%) et contenant une forte proportion (55-93%) de peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da), lesquels sont reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme. Cette étude a toutefois révélé que l'ajout de ces deux hydrolysats protéiques à un jus d'orange causait certains problèmes. Dans le cas de l'hydrolysat préparé à partir de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II, il a été démontré que suite au traitement thermique (100°C/7 min) des jus d'orange additionnés de cet hydrolysat selon des cotes protéiques variant de 16 à 28, l'apparence des jus était modifiée, avec un changement important de la coloration et l'apparition d'un dépôt blanchâtre inacceptable dans le produit. Par contre, la saveur de cet hydrolysat était plutôt neutre et celle des jus d'orange enrichis (~4% protéines) à partir de cet hydrolysat demeurait très acceptable. Dans le cas de l'hydrolysat préparé à l'aide de l'enzyme Alcalase, son évaluation dans le jus d'orange a démontré que cet ingrédient était mieux adapté à la fortification protéique des jus de fruits. En effet, l'apparence des jus d'orange suite à l'application d'un traitement thermique sévère (100°C/7 min) était peu modifiée même après l'ajout de cet hydrolysat à forte concentration (cotes protéiques de 16 à 28); en fait, la coloration des jus était intacte et aucun précipité n'était visible dans le produit. La saveur des jus quant à elle, était fortement affectée par l'ajout de cet hydrolysat avec l'apparition d'une note d'amertume très prononcée.

Le but de la présente étude était donc d'améliorer les caractéristiques des deux hydrolysats protéiques mis au point dans le cadre de ces travaux antérieurs (Rolland, 1999) afin d'accroître leur potentiel pour la fortification protéique de jus de fruits. Les problèmes de saveur rencontrés avec l'hydrolysat obtenu à l'aide de l'Alcalase, et les problèmes de



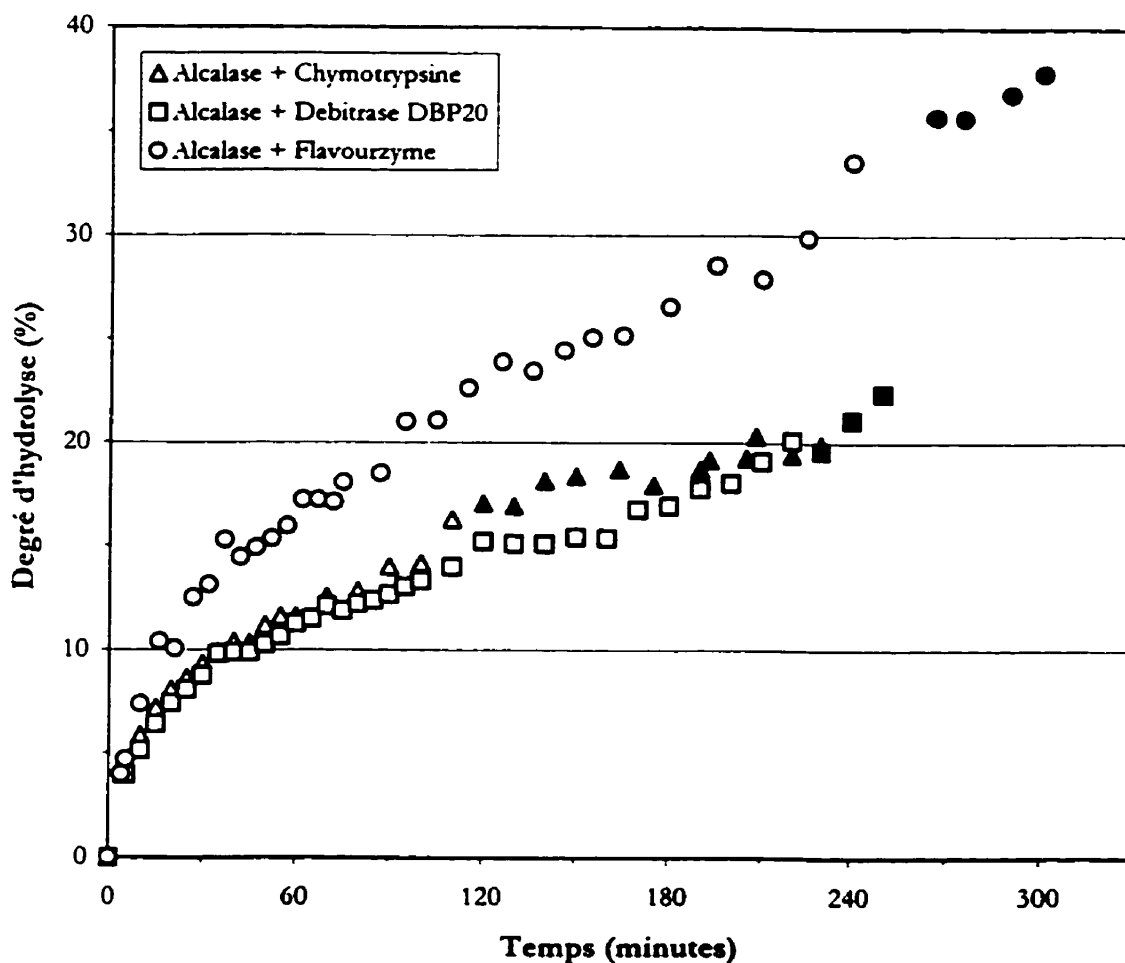
solubilité observés dans les jus d'orange additionnés de l'hydrolysats préparé à partir de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II devaient donc être résolus. La première étape de ce projet a donc été consacrée à la désamérisation enzymatique de l'hydrolysats préparé à l'aide de l'Alcalase. Dans le cas du problème de solubilité de l'hydrolysats fabriqué à partir de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II, le traitement d'inactivation thermique des enzymes, appliqué à la fin de la réaction enzymatique, a été remplacé par une étape d'ultrafiltration. En fait, la désactivation thermique des enzymes mène à la formation d'agrégats protéiques dans le milieu, lesquels sont associés à la baisse de solubilité observée dans ce type de produit. L'arrêt d'une réaction enzymatique via la séparation physique des enzymes par ultrafiltration permet alors d'éliminer le traitement thermique, mais également d'enrichir les hydrolysats en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da), un avantage non négligeable pour la préparation d'ingrédients hydrolysés destinés à des applications nutritionnelles. Il est à noter que l'ultrafiltration a aussi été appliquée dans le cas de l'hydrolysats désamérisé et ce, afin d'évaluer l'impact de ce procédé sur la solubilité de cet hydrolysats dans le jus d'orange et sur sa teneur en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da).

Dans le but de désamériser par voie enzymatique l'hydrolysats de protéines du lactosérum préparé à l'aide de l'Alcalase, trois préparations enzymatiques commerciales ont été sélectionnées: la Flavourzyme, la Debitrase DBP20 et la Chymotrypsine. La Flavourzyme est un mélange d'endo et d'exoprotéases d'origine fongique (*Aspergillus oryzae*), possédant une activité exopeptidasique prédominante mais dont la spécificité n'est pas précisée par le fabricant. Cette enzyme est fortement conseillée pour réduire l'amertume des hydrolysats protéiques, en particulier ceux préparés à partir de l'Alcalase. Il est à noter que l'Alcalase et la Flavourzyme sont toutes deux offertes par le même fabricant, soit Novo Nordisk. La Debitrase DBP20 est un mélange d'aminopeptidases de sources microbiennes, dérivées de *Lactococcus lactis* et de *Aspergillus oryzae*, dont l'hydrolyse est spécifique aux liens peptidiques composés d'acides aminés hydrophobes et de proline, avec une attaque en position N-terminale de la chaîne peptidique. Cette enzyme, offerte par la compagnie Imperial Biotechnology, est proposée pour la désamérisation des hydrolysats de protéines du

lactosérum. Dans le cas de la Chymotrypsine, il s'agit d'une endoprotéase de source animale (pancréas de bœuf), spécifique à l'hydrolyse des liens peptidiques du côté carboxyle des acides aminés suivants: Phe, Trp, Tyr, Leu, Met et His. Cette enzyme est vendue par Novo Nordisk pour la préparation d'hydrolysats protéiques et non pour la désamérisation enzymatique de ces produits. Nous avons aussi voulu vérifier si la combinaison de deux endoprotéases (Alcalase + Chymotrypsine) pour l'hydrolyse des protéines du lactosérum pouvait mener à la préparation d'un hydrolysats moins amer que celui obtenu avec l'Alcalase seule et ce, en raison de la spécificité de la Chymotrypsine envers les acides aminés hydrophobes qui sont associés à l'amertume (Matobe et Hata, 1972; Adler-Nissen, 1976; Yeom et al., 1994; Roudot-Algaron, 1996).

Les cinétiques d'hydrolyse de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) obtenues à l'aide de l'Alcalase combinée à l'une des trois enzymes étudiées sont illustrées à la Figure 1. On remarque que les protéines du lactosérum sont fortement hydrolysées par le mélange Alcalase/Flavourzyme, avec un degré d'hydrolyse (DH) de près de 40% après 300 minutes de réaction. Bien que la cinétique d'hydrolyse obtenue avec ce mélange accuse une légère baisse en début de réaction (30 min), la vitesse réactionnelle est par la suite quasi-constante jusqu'à la fin de la réaction. Dans le cas des mélanges Alcalase/Debitrase DBP20 et Alcalase/Chymotrypsine, les cinétiques d'hydrolyse sont comparables. Cependant les valeurs DH obtenues en fin de réaction (230-250 min) avec ces deux mélanges sont beaucoup plus faibles (~21%) que celle obtenue (DH ~40%) avec le mélange Alcalase/Flavourzyme et ce, en raison d'une baisse plus importante de la cinétique d'hydrolyse après 30 minutes de réaction.

Les symboles noirs sur le graphique (Figure 1) indiquent l'apparition d'un début de gélification dans les mélanges réactionnels. Bien que l'hydrolyse enzymatique soit reconnue pour mener à une diminution des propriétés gélifiantes d'une protéine (Mahmoud, 1994; Panyam et Kilara, 1996), de nombreux travaux sur l'hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum ont démontré l'aptitude à la gélification thermique de certains



**Figure 1 :** Comparaison des cinétiques d'hydrolyse de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) obtenues à l'aide de l'Alcalase, combinée à la Chymotrypsine, à la Debitrase DBP20 ou à la Flavourzyme. Les symboles noirs indiquent l'apparition d'un début de gélification dans le mélange réactionnel. Les cinétiques d'hydrolyse ont été suivies par la méthode pH-stat jusqu'à un degré d'hydrolyse de 4%, puis par osmométrie jusqu'à la fin de l'hydrolyse.

hydrolysats (Ju et al., 1995; Otte et al., 1996a; 1996b; Ju et Kilara, 1998). À la Figure 1, on note que pour les hydrolyses obtenues à l'aide des trois mélanges enzymatiques, un début de gélification apparaît dans le mélange réactionnel après 120, 230 et 266 minutes de réaction pour la Chymotrypsine, la Debitrase DBP20 et la Flavourzyme, respectivement. Sur la base de sa forte capacité d'hydrolyse des protéines du lactosérum et de l'apparition tardive de la gélification dans le milieu, la Flavourzyme a été sélectionnée pour l'hydrolyse de l'isolat de protéines du lactosérum en présence de l'Alcalase. D'autre part, afin d'éviter l'apparition d'un début de gélification dans le mélange réactionnel, la durée d'hydrolyse à l'aide du mélange Alcalase/Flavourzyme a été fixée à 180 minutes.

Une fois l'enzyme sélectionnée pour la désamérisation de l'hydrolysats préparé à l'aide de l'Alcalase, il fallait déterminer les conditions du traitement thermique permettant d'inactiver le mélange Alcalase/Flavourzyme en fin de réaction. Ce traitement thermique doit être suffisamment sévère pour assurer l'inactivation complète des enzymes, sans pour autant affecter la solubilité de l'hydrolysats final. D'autre part, les conditions de désactivation des enzymes sont variables et dépendantes de la stabilité des enzymes en fonction de la température, de la durée du traitement, du pH mais également du milieu environnant. Il fallait donc mesurer l'inactivation des enzymes au pH de l'hydrolysats en fin de réaction. Dans notre étude, toutes les réactions étant contrôlées par une combinaison des méthodes pH-stat et osmométrie, le pH des mélanges en fin de réaction se situe autour de 6.5. Les traitements thermiques étudiés ont donc été appliqués à des mélanges réactionnels ajustés à pH 6.5. L'efficacité de quatre traitements thermiques pour l'inactivation du mélange Alcalase/Flavourzyme a donc été comparée: 85°C/5 min, 75°C/10 min, 65°C/15 min, 55°C/20 min. Ces traitements ont été appliqués en fin de réaction, puis les mélanges ont été placés à nouveau dans les conditions optimales des enzymes pour une durée additionnelle de 60 minutes. Enfin, une mesure du ratio AN/TN a été réalisée immédiatement après l'application du traitement thermique, de même qu'après la durée d'hydrolyse additionnelle de 60 minutes. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont présentés au Tableau 1. En fait, le ratio AN/TN permet de mesurer la teneur en azote  $\alpha$ -aminé (AN) d'une solution protéique et par conséquent, une augmentation de ce ratio

**Tableau 1 :** Effet des conditions (T°/durée) du traitement thermique de désactivation des enzymes Alcalase et Flavourzyme sur le ratio AN/TN (%), mesuré après une hydrolyse de 30 minutes (T30) et une durée d'hydrolyse additionnelle de 60 minutes (T30+60).

<b>Échantillon</b>	<b>T30<sup>1</sup></b>	<b>T30+60<sup>2</sup></b>
<b>Traitement thermique</b>		
<b>85°C / 5 minutes</b>	20.0	18.9
<b>75°C / 10 minutes</b>	22.4	21.8
<b>65°C / 15 minutes</b>	23.0	24.1
<b>55°C / 20 minutes</b>	23.5	24.9

<sup>1</sup> T30: mélange réactionnel désactivé thermiquement après une hydrolyse de 30 minutes.

<sup>2</sup> T30+60: mélange réactionnel désactivé (T30), puis placé à nouveau dans les conditions optimales d'hydrolyse des enzymes pour une durée additionnelle de 60 minutes.

après l'inactivation thermique des enzymes indique la libération de groupements  $\alpha$ -aminés et la présence d'enzymes actives dans le milieu. Ces résultats démontrent que les traitements thermiques de 55°C/20 min et 65°C/15 min sont insuffisants pour assurer l'inactivation complète des enzymes en fin de réaction. En effet, les ratios AN/TN mesurés dans les mélanges réactionnels désactivés et placés à nouveau dans les conditions optimales d'hydrolyse des enzymes pour une durée additionnelle de 60 minutes (T30+60) sont supérieurs aux valeurs obtenues après 30 minutes de réaction (T30). Pour ces conditions de désactivation thermique (55°C/20 min, 65°C/15 min), une activité enzymatique résiduelle était donc présente dans le milieu. Par contre, les traitements thermiques de 75°C/10 min et 85°C/5 min assurent une inactivation complète des enzymes. Pour ces traitements, les ratios AN/TN mesurés après une durée d'hydrolyse additionnelle de 60 minutes dans les conditions optimales d'activité des enzymes sont inférieurs à ceux mesurés immédiatement après le chauffage des mélanges. Pour la désactivation thermique du mélange Alcalase/Flavourzyme, un traitement de 75°C/10 min a donc été sélectionné. Dans le cas de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II, ses conditions de désactivation thermique ont été fixées à 75°C/10 min, à partir d'une étude comparable réalisée dans le cadre de travaux antérieurs (Rolland, 1999).

Une fois l'enzyme désamérisante sélectionnée (Flavourzyme) de même que les conditions de désactivation du mélange Alcalase/Flavourzyme, deux hydrolysats ont été préparés à partir de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et à l'aide de l'enzyme Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II et du mélange Alcalase/Flavourzyme. Les cinétiques d'hydrolyse du Bipro<sup>®</sup> obtenues à l'aide de ces enzymes sont illustrées à la Figure 2. On note que les cinétiques d'hydrolyse obtenues avec ces enzymes sont très différentes. En effet, l'hydrolyse des protéines du lactosérum à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II est beaucoup plus lente que celle obtenue avec le mélange Alcalase/Flavourzyme. Après 150 minutes de réaction, une valeur DH de 10% est obtenue avec la première enzyme alors que cette valeur est supérieure à 20% après 180 minutes de réaction avec le mélange enzymatique. Cette différence dans la cinétique d'hydrolyse des protéines s'explique par

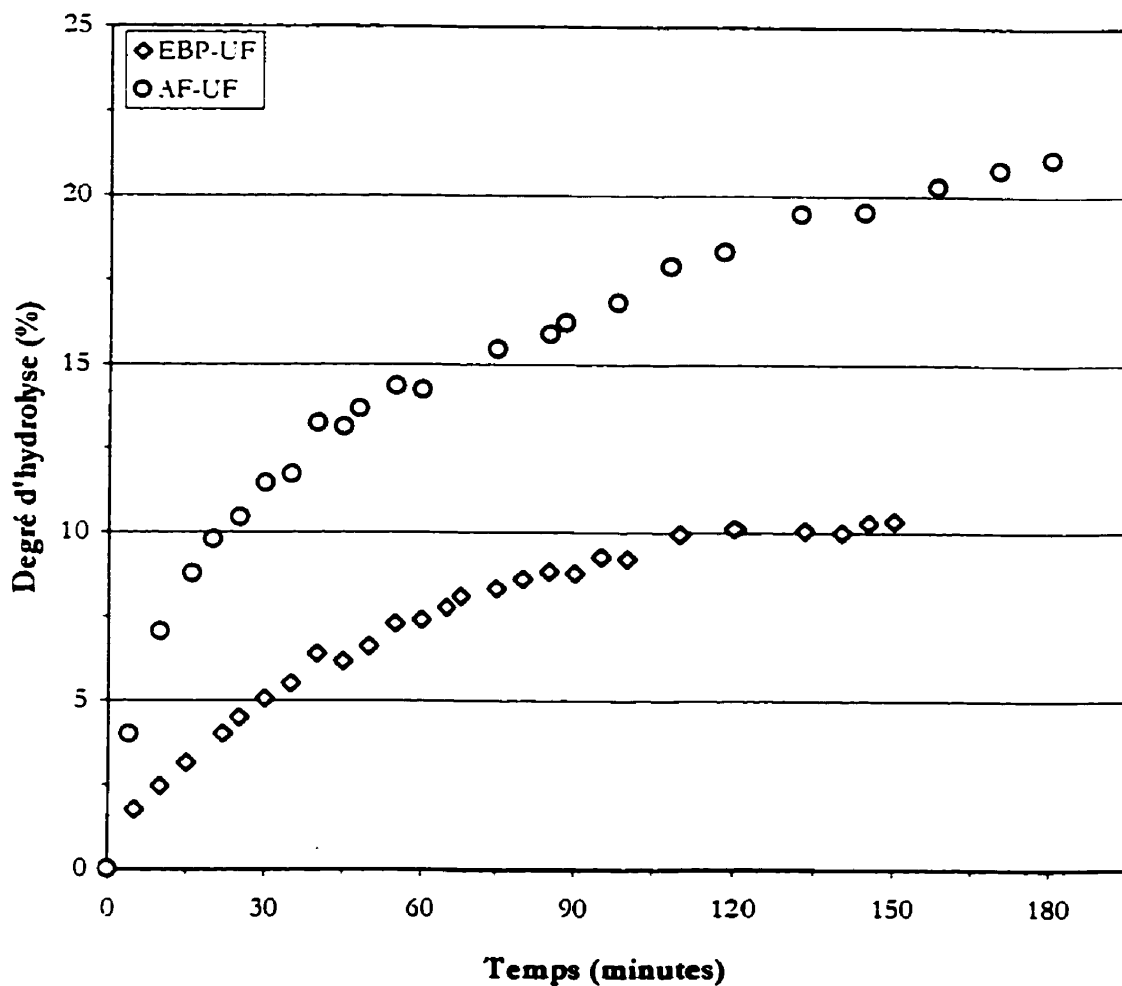


Figure 2 : Cinétiques d'hydrolyse de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) obtenues à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF). Les cinétiques d'hydrolyse ont été suivies par la méthode pH-stat jusqu'à un degré d'hydrolyse de 4%, puis par osmométrie jusqu'à la fin de l'hydrolyse où les réactions ont été stoppées par ultrafiltration (UF).

l'action synergique du mélange d'une exoprotéase (Flavourzyme) et d'une endoprotéase (Alcalase), qui mène à l'hydrolyse d'un nombre plus important de liens peptidiques.

Les hydrolyses réalisées à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II et du mélange Alcalase/Flavourzyme et dont les cinétiques sont illustrées à la Figure 1, ont été stoppées par ultrafiltration (30 kda) des milieux réactionnels. Dans le cas de l'hydrolyse avec le mélange Alcalase/Flavourzyme, une partie du mélange réactionnel a également été désactivée par l'application du traitement thermique sélectionné (75°C/10 min) et ce, afin de vérifier l'impact de ce traitement sur la solubilité des hydrolysats et leur teneur en peptides de faibles poids moléculaires.

Lors de l'ultrafiltration, les rendements en matière sèche obtenus dans le cas des hydrolysats préparés avec l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II et le mélange enzymatique (Alcalase/Flavourzyme) ont été de 52 et 58%, respectivement. Ces rendements sont comparables à ceux obtenus (~60%), par Turgeon et Gauthier (1990) pour l'ultrafiltration d'hydrolysats trypsique et chymotrypsique de protéines du lactosérum. L'ultrafiltration entraîne donc des pertes en matières sèches de l'ordre de 40% lors du fractionnement des hydrolysats enzymatiques de protéines du lactosérum, ces dernières devant être considérées dans le coût de fabrication de l'ingrédient hydrolysé. Par contre, ces pertes en matières sèches pourraient être justifiées par une amélioration des caractéristiques des hydrolysats protéiques destinés à la fortification protéique des jus de fruits. Par ailleurs, une étude pourrait être réalisée en vue de découvrir des voies de valorisation des rétentats d'ultrafiltration inactivés. Pour évaluer les avantages de l'ultrafiltration, les hydrolysats ont donc été caractérisés en termes de composition chimique, teneur en minéraux, ratio AN/TN et profil du poids moléculaire de leurs composantes protéiques. Les résultats de cette caractérisation sont présentés au Tableau 2.

L'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) utilisé pour la fabrication des hydrolysats protéiques est un ingrédient riche en protéines (93.6%), contenant des traces (<1%) de lipides et de lactose et une très faible teneur en cendres (~2%), principalement composée



**Tableau 2 :** Composition chimique, ratio AN/TN et profils de poids moléculaires des composantes protéiques de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF).

	Bipro <sup>®</sup>	EBP - TT <sup>1</sup>	EBP - UF	AF - TT	AF - UF
<b>Composantes (%)</b>					
<b>Protéines</b>	93.6	86.5	87.8	89.8	86.5
<b>Lipides</b>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>Lactose</b>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>Cendres</b>	2.1	4.1	5.0	6.7	8.9
<b>Minéraux (mg/g)</b>					
<b>K</b>	0.8	10.7	10.9	8.6	10.4
<b>Na</b>	5.7	7.6	11.0	19.1	22.8
<b>Ca</b>	0.9	1.1	0.7	1.1	0.9
<b>Mg</b>	0.1	0.3	0	0	0
<b>P</b>	0.1	0.2	0.6	0	0
<b>AN/TN (%)</b>	8.8	16.7	19.6	24.2	29.2
<b>Profil de poids moléculaires (%)</b>					
<b>&gt; 10000 da</b>	98.6	34.2	10.7	19.3	1.4
<b>5000-10000 da</b>	0.8	10.9	14.6	8.9	8.9
<b>&lt; 5000 da</b>	0.6	54.9	74.7	71.8	89.7

<sup>1</sup> Les données de cet hydrolysat protéique ont été tirées du mémoire de Martin Rolland (1999).

de sodium (5.7 mg/g). Après hydrolyse enzymatique, les teneurs en protéines des hydrolysats varient de 86.5 à 89.8%. Cette diminution de la teneur en protéines s'explique par une augmentation du contenu en cendres des hydrolysats, conséquence de l'ajustement du pH en début d'hydrolyse (DH de 4%) par l'ajout d'un mélange de bases (NaOH/KOH). L'ajout de ce mélange de base explique également l'augmentation des teneurs en potassium et en sodium dans les hydrolysats, qui s'élèvent alors à 9-11 mg/g et 8-23 mg/g, respectivement. On remarque également que les hydrolysats préparés à partir du mélange Alcalase/Flavourzyme contiennent des quantités plus élevées de sodium que ceux préparés avec l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II; cette différence pourrait s'expliquer par la composition minérale des préparations enzymatiques. On note également que les teneurs en cendres des hydrolysats ultrafiltrés sont supérieures (5-9%) à celles des hydrolysats traités thermiquement (4-7%) en raison du passage des minéraux à travers les membranes d'ultrafiltration et leur concentration dans le perméat.

Dans le cas du ratio AN/TN, l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) présente une valeur de 8.8%, ce qui représente la teneur en azote  $\alpha$ -aminé libre dans le substrat de départ. Les valeurs AN/TN obtenues pour les hydrolysats protéiques reflètent le degré d'hydrolyse atteint en fin de réaction (Figure 2). En effet, dans le cas de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II, un ratio AN/TN de 16.7% a été obtenu alors que dans le cas du mélange Alcalase/Flavourzyme, l'hydrolyse plus poussée des protéines a conduit à un ratio AN/TN plus élevé, soit 24.2%. Les valeurs obtenues pour les hydrolysats ultrafiltrés sont supérieures à celles obtenues pour les hydrolysats désactivés thermiquement et ce, en raison du passage des peptides de faibles poids moléculaires qui contribue à augmenter la teneur en azote  $\alpha$ -aminé des hydrolysats ultrafiltrés.

Le profil de distribution du poids moléculaire des composantes protéiques des différents ingrédients reflète également le degré d'hydrolyse des protéines (Tableau 2). Dans le cas de l'isolat de protéines (Bipro<sup>®</sup>), les protéines sont intactes et sa teneur en composantes de poids moléculaires supérieurs à 10 000 da est de 98.6%. Suivant son hydrolyse à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II, on observe une dégradation importante des protéines

(>10000 da) en composantes de faibles poids moléculaires avec près de 55% de peptides de taille inférieure à 5000 da. Dans le cas de l'hydrolysats obtenu à l'aide du mélange Alcalase/Flavourzyme, la proportion de peptides de petites tailles est supérieure à 70%, ce qui illustre la plus grande efficacité de ce mélange enzymatique pour l'hydrolyse des protéines du lactosérum. De plus, pour cet hydrolysats (AF-TT), une partie des peptides de poids moléculaires élevés (17.8% de >10000 da) provient de la présence d'agrégats protéiques insolubles qui sont formés suite au traitement thermique appliqué pour la désactivation des enzymes (75°C/10 min). En raison de leur présence, la solubilité des protéines dans la phase mobile (tampon phosphate) utilisée pour les analyses de chromatographie (HPSEC) est diminuée à 82%. Ce phénomène d'agrégation thermique n'est toujours pas élucidé, mais il se pourrait que la présence du groupement SH libre dans la structure de la  $\beta$ -lactoglobuline mène à la formation de ces agrégats. En effet, ce groupement SH est très réactif au pH de l'hydrolyse (pH 8.0) et à la température de désactivation des enzymes, soit 75°C (Lee et al., 1992; Xiong, 1992). Dans le cas de l'hydrolysats obtenu à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP-TT), il présente une solubilité de 100% dans la phase mobile.

L'arrêt de la réaction d'hydrolyse par ultrafiltration permet d'éliminer les enzymes et les protéines non hydrolysées, tout en évitant la formation d'agrégats protéiques. Par conséquent, en comparant les hydrolysats désactivés par traitement thermique avec ceux désactivés par ultrafiltration, on remarque que la proportion de peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da) est supérieure dans les hydrolysats ultrafiltrés (~75-90%). L'ultrafiltration est donc un procédé très efficace pour enrichir les hydrolysats en peptides de faibles poids moléculaires.

La seconde étape de ce projet consistait à évaluer le potentiel de ces hydrolysats pour la fortification protéique d'un jus d'orange. En fait, dans le cas d'un jus de fruits à pH acide, l'ajout de protéines peut mener à des problèmes d'insolubilité de la source protéique. La solubilité du substrat de départ (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a donc été évaluée suivant leur addition dans l'eau, dans une solution modèle et dans un jus d'orange. La

**Tableau 3 :** Indice de solubilité de l'azote (NSI, %) mesuré dans l'eau, dans la solution modèle et dans le jus d'orange additionnés de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF).

<b>Échantillons</b>	<b>Bipro<sup>®</sup></b>	<b>EBP - TT<sup>1</sup></b>	<b>EBP - UF</b>	<b>AF - TT</b>	<b>AF - UF</b>
<b>Milieux</b>					
<b>Eau (pH 7.0)</b>	98.9	99.8	99.1	88.3	98.8
<b>Solution modèle (pH 2.6)</b>	92.7	68.7	99.9	94.4	99.7
<b>Jus d'orange (pH 3.8)</b>	83.9	67.3	90.5	91.8	93.3

<sup>1</sup> Les données de cet hydrolysats protéique ont été tirées du mémoire de Martin Rolland (1999).

solution modèle a été préparée dans l'eau distillée additionnée de sucre inverti (9.2%), de pectine (4.8%) et d'acide citrique (0.5%), de façon à reproduire les conditions physico-chimiques d'un jus de fruits. Le Tableau 3 présente les résultats obtenus pour la mesure de solubilité (méthode NSI) des différents ingrédients protéiques dans les trois milieux étudiés.

Le Bipro<sup>®</sup>, très soluble (98.9%) en solution aqueuse, perd un peu de solubilité (92.7%) dans la solution modèle à pH 2.6 alors que sa solubilité dans le jus d'orange est la plus faible, soit ~84%. Dans le cas de l'hydrolysate obtenu avec l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II et désactivé par traitement thermique (EBP-TT), sa solubilité dans l'eau (pH 7.0) est comparable à celle du Bipro<sup>®</sup> (99.8%), mais elle diminue de façon importante à pH acide, avec des valeurs d'environ 68% dans la solution modèle (pH 2.6) et dans le jus d'orange (pH 3.8). On remarque également que suite à l'arrêt de la réaction par ultrafiltration (EBP-UF), la solubilité de cet hydrolysate est grandement améliorée à pH acide, avec des valeurs se situant entre 91 et 99%. L'absence d'agrégats protéiques dans cet hydrolysate ultrafiltré explique probablement les valeurs plus élevées de solubilité obtenues dans la solution modèle et dans le jus d'orange.

Dans le cas de l'hydrolysate obtenu à l'aide du mélange Alcalase/Flavourzyme et désactivé par traitement thermiquement (AF-TT), sa solubilité en solution aqueuse est plus faible (88.3%) que celle du Bipro<sup>®</sup> (99.8%), mais elle est peu influencée par les conditions du milieu. Sa solubilité varie de 92 à 94% qu'il soit additionné à la solution modèle ou au jus d'orange. L'écart observé dans la solubilité des deux hydrolysates protéiques s'explique probablement par leurs profils peptidiques. En effet, les teneurs en peptides de poids moléculaires élevés (>10000 da) sont de 34.2 et de 19.3% pour l'hydrolysate EBP-TT et AF-TT, respectivement (Tableau 2). La plus grande quantité d'agrégats protéiques dans l'hydrolysate EBP-TT explique probablement sa plus faible solubilité. Enfin, la solubilité de l'hydrolysate ultrafiltré AF-UF est comparable à celle de l'hydrolysate obtenu à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP-UF), soit près de 100% en solution aqueuse et dans la solution modèle, alors qu'elle est de 93% dans le jus d'orange.

Dans le but d'évaluer l'impact de la solubilité des ingrédients protéiques sur l'apparence du produit, la turbidité de la solution modèle a été évaluée suivant l'ajout du substrat de départ et des hydrolysats selon différents niveaux d'incorporation, correspondant à des cotes protéiques de 16, 20, 24 et 28. La cote protéique se définit comme la quantité de protéines (g) ajoutée à une portion de jus de 175 ml, multipliée par le coefficient d'efficacité protéique de la protéine (CEP); les protéines du lactosérum possèdent un CEP de 3.2 (Dibley, 1997). Le Tableau 4 présente les résultats de cette analyse. À noter qu'en raison de son opacité, cette analyse n'a pas été réalisée dans le jus d'orange.

Les résultats démontrent que les protéines du lactosérum à l'état natif (Bipro<sup>®</sup>) et les hydrolysats désactivés par traitement thermique (EBP-TT et AF-TT) donnent des solutions opaques, avec des valeurs de transmittance à 610 nm proches de 0. Par contre, les hydrolysats ultrafiltrés (EBP-UF et AF-UF) ne sont pas turbides et les valeurs de transmittance (~1.0) sont en accord avec la solubilité mesurée pour ces échantillons dans la solution modèle (Tableau 3). L'absence d'agrégats protéiques dans ces hydrolysats explique probablement l'amélioration de la transmittance des solutions.

Afin d'évaluer l'impact de l'ajout des ingrédients protéiques sur la texture du produit, la viscosité de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques a été évaluée suivant leur addition dans la solution modèle et dans le jus d'orange selon les quatre cotes protéiques à l'étude. Les résultats de cette analyse sont présentés au Tableau 5. Dans le cas du Bipro<sup>®</sup>, son ajout à la solution modèle selon les quatre cotes protéiques influence de façon négligeable la viscosité de cette solution (5.3 cp). En effet, l'ajout de 8.75g de protéines (cote protéique de 28) dans 175 ml de solution modèle augmente la viscosité à moins de 8 cp. Un comportement similaire est observé suite à l'ajout du Bipro<sup>®</sup> dans le jus d'orange, où la viscosité de ce dernier passe de 11.1 à 14.9 cp pour la cote protéique la plus élevée (28). Dans le cas des hydrolysats protéiques, on note que la viscosité qu'ils confèrent à la solution modèle et au jus d'orange est directement liée à leur solubilité dans ces milieux (Tableau 3). La faible solubilité (~68%) de l'hydrolysat EBP-TT dans ces milieux entraîne une augmentation importante de la viscosité, surtout

**Tableau 4 :** Turbidité (transmittance à 610 nm) de la solution modèle additionnée selon quatre cotes protéiques (CP) de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF).

<b>Échantillons</b>	<b>Bipro<sup>®</sup></b>	<b>EBP - TT<sup>1</sup></b>	<b>EBP - UF</b>	<b>AF - TT</b>	<b>AF - UF</b>
<b>Milieu</b>					
<b>Solution modèle (pH 2.6)</b>					
<b>CP 16</b>	0	0	0.98	0.05	0.98
<b>CP 20</b>	0	0	0.97	0.03	0.97
<b>CP 24</b>	0	0	0.98	0.02	0.98
<b>CP 28</b>	0	0	0.98	0.01	0.97

<sup>1</sup> Les données de cet hydrolysat protéique ont été tirées du mémoire de Martin Rolland (1999).

**Tableau 5 :** Viscosité (cp  $\pm$  1 cp) de la solution modèle et du jus d'orange additionnés selon quatre cotes protéiques (CP) de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF).

Échantillons	Bipro <sup>®</sup>	EBP - TT <sup>1</sup>	EBP - UF	AF - TT	AF - UF
<b>Milieux</b>					
<b>Solution modèle<sup>2</sup> (pH 2.6)</b>					
<b>CP 16</b>	6.2	5.3	6.2	6.2	5.6
<b>CP 20</b>	6.7	6.1	6.3	6.5	5.8
<b>CP 24</b>	6.8	6.8	6.4	6.7	5.9
<b>CP 28</b>	7.3	7.8	6.5	6.9	6.0
<b>Jus d'orange<sup>3</sup> (pH 3.8)</b>					
<b>CP 16</b>	13.1	21.3	12.1	14.3	12.1
<b>CP 20</b>	14.0	24.4	12.2	15.2	12.2
<b>CP 24</b>	14.2	27.2	12.5	16.4	12.2
<b>CP 28</b>	14.9	32.9	12.5	17.5	12.4

<sup>1</sup> Les données de cet hydrolysat protéique ont été tirées du mémoire de Martin Rolland (1999).

<sup>2</sup> La viscosité de la solution modèle seule est de 5.3 cp.

<sup>3</sup> La viscosité du jus d'orange seul est de 11.1 cp.



dans le jus d'orange où des valeurs de 21-33 cp sont obtenues pour des cotes protéiques de 16 à 28. Le même phénomène est observé avec l'hydrolysate AF-TT, avec toutefois des valeurs de viscosité moins élevées dans le jus d'orange (14-18 cp) que celles de l'hydrolysate EBP-TT et ce, en raison de sa meilleure solubilité (~92%) dans le jus d'orange. Enfin, les deux hydrolysates ultrafiltrés étant solubles à plus de 90% dans la solution modèle et dans le jus d'orange, ils influencent faiblement la viscosité des milieux pour les quatre cotes protéiques à l'étude.

La solubilité des ingrédients protéiques dans la solution modèle et dans le jus d'orange a ensuite été évaluée suivant l'application d'un traitement thermique reproduisant les conditions de pasteurisation des jus de fruits en industrie. Ce traitement, proposé par la compagnie A. Lassonde Inc., consistait à préparer les solutions modèles et les jus d'orange fortifiés en protéines dans des bouteilles de verre, lesquelles étaient ensuite plongées dans un bain-marie à 100°C pour une durée de 7 minutes. Selon la compagnie, un ingrédient ne pourra subir l'étape de pasteurisation s'il mène à l'apparition d'un précipité dans le produit, suite à l'application de ce traitement thermique.

Le Tableau 6 présente les valeurs de solubilité mesurées (méthode NSI modifiée) suivant le traitement thermique (100°C/7 min) de la solution modèle et du jus d'orange additionnés de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysates protéiques selon les quatre cotes protéiques sélectionnées. De nombreux auteurs ont démontré que l'hydrolyse enzymatique permet d'améliorer la solubilité des protéines lors des traitements thermiques (ex.: pasteurisation) appliqués aux produits (Haque, 1993; Frøkjær, 1994; Mahmoud, 1994), et les résultats de la présente étude confirment ces observations. En effet, suite au traitement thermique, le Bipro<sup>®</sup> est quasi-insoluble dans la solution modèle (4-9%) alors que dans le jus d'orange, sa solubilité augmente mais demeure inférieure à 45%. Ce résultat est directement lié à l'insolubilité thermique de la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg), principale protéine du lactosérum. À des températures de 70-85°C et en milieu acide (pH 4.5), la  $\beta$ -lg se présente sous forme dénaturée et insoluble. À ce pH, il y aurait coagulation

**Tableau 6 :** Indice de solubilité de l'azote (NSI, %) mesuré après le traitement thermique (100°C/7 min) de la solution modèle et du jus d'orange additionnés selon quatre cotes protéiques (CP) de l'isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF).

Échantillons	Bipro <sup>®</sup>	EBP - TT <sup>1</sup>	EBP - UF	AF - TT	AF - UF
<b>Milieux</b>					
<b>Solution modèle (pH 2.6)</b>					
<b>CP 16</b>	9.3	88.2	98.1	80.7	98.9
<b>CP 20</b>	6.3	74.9	98.6	83.8	99.6
<b>CP 24</b>	5.4	76.1	99.7	86.4	99.0
<b>CP 28</b>	4.1	77.9	97.7	87.3	98.7
<b>Jus d'orange (pH 3.8)</b>					
<b>CP 16</b>	25.1	66.4	95.8	84.1	100.0
<b>CP 20</b>	34.3	71.0	94.4	86.7	100.0
<b>CP 24</b>	34.6	72.6	96.8	86.6	100.0
<b>CP 28</b>	44.5	73.3	97.9	88.3	100.0

<sup>1</sup> Les données de cet échantillon ont été tirées du mémoire de Martin Rolland (1999).

des protéines par agrégation et formation de liens disulfures intermoléculaires avec des protéines voisines (de Wit et Klarenbeek, 1981; Pearce, 1989).

On remarque également que la solubilité du Bipro<sup>®</sup> dans la solution modèle diminue avec l'augmentation de la concentration en protéines, alors que l'effet contraire est observé dans le jus d'orange. La solubilité des protéines du lactosérum étant étroitement liée au pH et à la force ionique du milieu (Kinsella, 1984; Kinsella et al., 1989; de Wit, 1989a), il est probable que l'environnement physico-chimique du jus d'orange soit plus favorable à la solubilisation de ces protéines. L'écart observé entre la solution modèle et le jus d'orange pourrait aussi s'expliquer par la présence de certains composés dans le jus d'orange, comme des sucres ou des minéraux qui permettraient de stabiliser les protéines à la chaleur. Des études ont d'ailleurs démontré l'effet protecteur de certains sucres (ex.: lactose, sucrose) et de certains ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) lors du traitement thermique de plusieurs protéines, dont la  $\beta$ -lactoglobuline (Kinsella et al., 1989; Jelen, 1992; Mangino, 1992; Morr et Ha, 1993). L'apparition d'un phénomène de «salting-in» pourrait aussi être à l'origine de l'augmentation de la stabilité thermique des protéines dans le jus d'orange. Ainsi la formation d'interactions ion-protéine permettrait de diminuer les interactions protéine-protéine et donc, d'augmenter la mise en solution des protéines. Il se pourrait aussi que des interactions entre les protéines et les polysaccharides (ex.: pectine) présents dans le jus d'orange contribuent à améliorer leur solubilité (Samant et al., 1993; Tolstoguzov, 1997; Schmitt et al., 1998; Syrbe et al., 1998), surtout suivant l'application d'un traitement thermique.

Suite à l'hydrolyse enzymatique, une amélioration très importante de la stabilité thermique des protéines est observée. En effet, tous les hydrolysats présentent une solubilité supérieure à 66% suite au traitement thermique, peu importe le milieu ou la cote protéique étudiés. Il est possible que des interactions protéine-peptide soient à l'origine de cette amélioration de la stabilité thermique des protéines du lactosérum, comme l'on démontré les travaux de Barbeau et al. (1996). Ces auteurs ont effectivement démontré que les fragments 41-60 et 21-40 de la  $\beta$ -lactoglobuline, isolés d'un hydrolysat trypsique de

protéines du lactosérum, permettent d'améliorer la stabilité thermique de cette protéine et ce, par voie d'interactions spécifiques (ionique ou hydrophobe). Selon ces auteurs, le caractère hydrophobe de ces peptides leur permettraient d'interagir avec le cœur hydrophobe de la  $\beta$ -lg, stabilisant aussi la conformation de la protéine (Barbeau et al., 1996).

Dans le cas de l'hydrolysate EBP-TT, sa solubilité varie de 66 à 88% selon le milieu et la cote protéique étudiés, avec des valeurs de solubilité supérieures dans la solution modèle comparées à celles obtenues dans le jus d'orange. Pour l'hydrolysate AF-TT, sa solubilité demeure supérieure à 80% qu'il soit ajouté à la solution modèle ou au jus d'orange, peu importe la cote protéique. Mais ce sont les hydrolysats ultrafiltrés (EBP-UF et AF-UF) qui sont les plus solubles après le traitement thermique de la solution modèle et du jus d'orange. En effet, la solubilité de ces hydrolysats demeure supérieure à 94% peu importe les conditions étudiées (milieu, cote protéique) et elle atteint même une valeur de 100% dans le cas des jus d'orange enrichis avec l'hydrolysate AF-UF.

De façon à reproduire les conditions industrielles de production d'un jus de fruits fortifié en protéines hydrolysées, la stabilité thermique des hydrolysats protéiques a finalement été évaluée suite à la pasteurisation ( $86 \pm 2^\circ\text{C}/17$  sec) de jus d'orange fortifiés en ces hydrolysats selon une cote protéique de 20 (6.25g protéines/175 ml). Les résultats de cette étude sont présentés au Tableau 7. À noter que la solubilité du substrat de départ (Bipro<sup>®</sup>) n'a pas été évaluée dans ces conditions, en raison de sa faible solubilité mesurée dans le jus d'orange suite à l'application du traitement thermique de  $100^\circ\text{C}/7$  minutes (Tableau 6). Suivant la pasteurisation, la solubilité des hydrolysats protéiques dans le jus d'orange se compare à celle obtenue dans le cadre de l'étude précédente (Tableau 6). Ainsi, la solubilité des hydrolysats traités thermiquement (EBP-TT et AF-TT) est de 71 - 86%, alors que celle des hydrolysats ultrafiltrés (EBP-UF et AF-UF) est supérieure à 98%. Encore ici, l'ultrafiltration se révèle une méthode très efficace pour améliorer la solubilité des hydrolysats dans le jus d'orange après l'application d'un traitement thermique sévère.

**Tableau 7 :** Indice de solubilité de l'azote (NSI, %) mesuré après la pasteurisation ( $86 \pm 2^\circ\text{C}/17 \text{ sec}$ ) de jus d'orange additionnés selon une cote protéique de 20 des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup>bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF).

<b>Échantillons</b>	<b>Bipro<sup>®</sup></b>	<b>EBP - TT</b>	<b>EBP - UF</b>	<b>AF - TT</b>	<b>AF - UF</b>
<b>Milieu</b>					
<b>Jus d'orange (pH 3.8)</b>					
<b>CP 20</b>	ND <sup>1</sup>	70.8	99.8	86.3	98.3

<sup>1</sup> : Non déterminé en raison de l'insolubilité du Bipro<sup>®</sup> dans le jus d'orange suite à l'application du traitement thermique de  $100^\circ\text{C}/7 \text{ minutes}$  (Tableau 6).

Afin de visualiser l'apparence des jus fortifiés (cote protéique de 20) en protéines et traités par pasteurisation, une photographie de ces jus est présentée à la Figure 3. La photographie a été réalisée après 48 heures d'entreposage des jus à 4°C, et leur apparence est le reflet des résultats obtenus au Tableau 7. En effet, l'hydrolysate EBP-TT, dont la solubilité est la plus faible (70.8%) suite au traitement de pasteurisation (Tableau 7), confère une coloration blanchâtre au jus d'orange avec l'apparition d'un dépôt très important dans la bouteille. Dans le cas de l'hydrolysate AF-TT, pour lequel la solubilité dans le jus pasteurisé est plus élevée (86.3%), la coloration du produit se rapproche de celle du témoin, mais un dépôt est toujours visible dans la bouteille. Par contre, l'apparence des jus d'orange est très peu modifiée par l'ajout des hydrolysates ultrafiltrés (EBP-UF et AF-UF), probablement en raison de leur grande solubilité (>98%) dans le jus d'orange pasteurisé (Tableau 7). Enfin, on remarque que le jus d'orange additionné de Bipro<sup>®</sup> a perdu sa coloration orangée, pour donner un produit blanchâtre avec la présence d'un dépôt très important. À noter que le traitement thermique de 86°C/17 secondes subit par cet échantillon a été réalisé par immersion dans un bain-marie et non à l'aide du pasteurisateur à plaques, comme pour les autres échantillons.

La dernière étape de cette étude consistait à évaluer l'effet de la Flavourzyme sur la désamérisation de l'hydrolysate préparé à l'aide de l'Alcalase. Pour cette étude, l'amertume de l'hydrolysate obtenu avec l'Alcalase seule, et préparé dans le cadre d'un projet antérieur (Rolland, 1999), a été évaluée en comparaison de celle de l'hydrolysate obtenu à partir du mélange Alcalase/Flavourzyme. Cette évaluation de l'amertume a été réalisée à l'aide d'un test de comparaison par paire, en utilisant un panel composé de 27 juges entraînés. Les résultats de ce test ont démontré que l'hydrolysate «Alcalase» était significativement plus amer que l'hydrolysate obtenu à l'aide du mélange Alcalase/Flavourzyme. Parmi les 27 juges composant le panel de dégustation, 20 ont conclu que l'hydrolysate «Alcalase» était plus amer. D'après la table statistique de Roessler (Roessler et al., 1978), le minimum de «bonnes réponses» (par bonne réponse on entend l'hydrolysate supposé être le plus amer, soit l'hydrolysate «Alcalase») nécessaire pour établir une différence significative ( $p < 0.05$ )

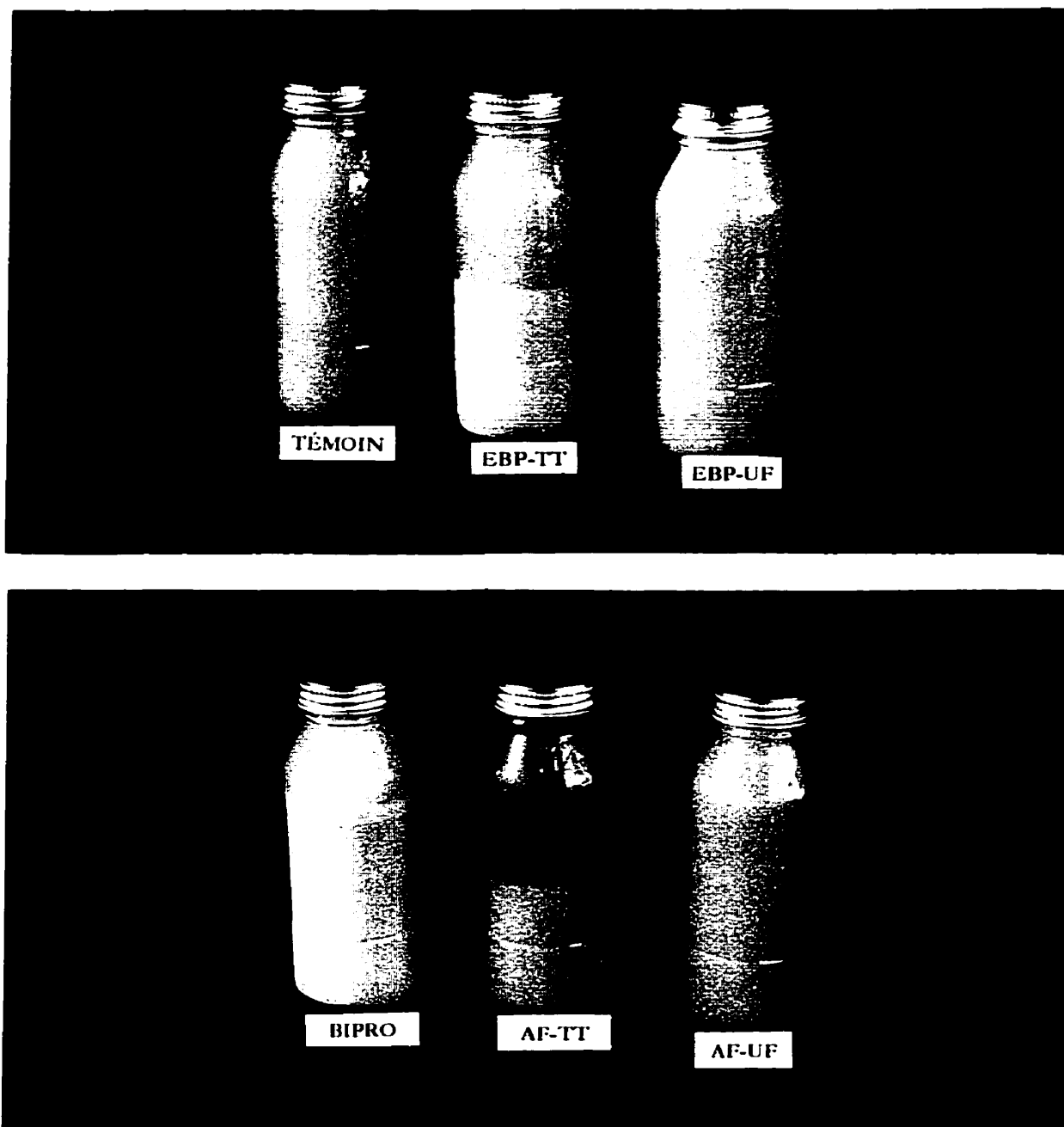


Figure 3 : Apparence des jus d'orange fortifiés en protéines suite à l'application du traitement de pasteurisation (86°C/17 sec). Les jus ont été additionnés (cote protéique de 20) de Bipro<sup>®</sup> et des hydrolysats protéiques obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II (EBP) et d'une combinaison des enzymes Alcalase et Flavourzyme (AF); les hydrolysats protéiques ont été désactivés soit par traitement thermique (TT), soit par ultrafiltration (UF). Le témoin est un jus d'orange nature.

entre deux échantillons, lors d'un test de comparaison par paire réalisé sur 27 jugements, est de 18. Par conséquent, les 20 «bonnes réponses» obtenues dans le cadre de cette étude nous permettent de conclure que l'hydrolysât obtenu à l'aide du mélange Alcalase/Flavourzyme présente une amertume significativement plus faible que celui préparé à l'aide de l'Alcalase seule. Ces résultats indiquent donc que la Flavourzyme est une enzyme efficace pour la désamérisation d'un hydrolysât de protéines du lactosérum préparé à l'aide de l'Alcalase.

En conclusion, les hydrolysats de protéines du lactosérum préparés dans le cadre de ces travaux à l'aide de l'enzyme Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II et du mélange Alcalase/Flavourzyme présentent de nombreux avantages nutritionnels pour la fortification protéique des jus de fruits. En effet, ces hydrolysats ultrafiltrés sont fortement hydrolysés (AN/TN>19%) et contiennent une forte proportion (>75%) de peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da), surtout lorsque la réaction d'hydrolyse est stoppée par ultrafiltration. De plus, additionnés à un jus d'orange selon une cote protéique de 20, ces hydrolysats présentent une solubilité de près de 100% suite à l'application d'un traitement de pasteurisation reproduisant les conditions industrielles de fabrication des jus de fruits. Enfin, l'ajout de Flavourzyme lors de l'hydrolyse des protéines du lactosérum à l'aide de l'Alcalase a permis de réduire, de façon significative ( $p < 0.05$ ), l'amertume de cet hydrolysât.



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet de recherche avait pour but la mise au point d'un hydrolysats enzymatique de protéines du lactosérum destiné à la fortification protéique d'un jus de fruits et ce, en vue de la préparation d'une boisson «nutraceutique». La problématique développée à la base de ce travail voulait qu'à l'état natif, les protéines du lactosérum coagulent lors d'un traitement thermique sévère (ex.: pasteurisation), limitant ainsi leur addition à forte concentration (cote protéique de 20) dans les jus de fruits. Dans ce projet, l'hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum visait donc à améliorer la solubilité de ces protéines dans l'environnement physico-chimique des jus de fruits, mais également à conférer un avantage nutritionnel à ce type d'ingrédient via la production d'une quantité importante de peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da), lesquels sont reconnus pour leur assimilation rapide par l'organisme.

Ce projet de recherche s'inscrit à la suite des travaux de maîtrise de M. Rolland (1999), dont l'objectif général était la mise au point des conditions d'hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum pour l'obtention d'ingrédients riches en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da). Dans ces travaux, deux hydrolysats enzymatiques de protéines du lactosérum ont été préparés à l'aide des enzymes Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II et Alcalase. Ces ingrédients étaient fortement hydrolysés (AN/TN~17-23%), riches en protéines (88-93%), contenaient une teneur en cendres acceptable (~4%) et une forte proportion (55-93%) de peptides de petites tailles (<5000 da). Additionnés à un jus d'orange selon une cote protéique de 20, ces ingrédients demeuraient solubles à plus de 70% suivant l'application d'un traitement thermique sévère (100°C/7 min). Les résultats de cette étude ont toutefois révélé certains problèmes, notamment au niveau de l'apparence et de la saveur des jus fortifiés avec ces hydrolysats protéiques. Les jus additionnés de l'hydrolysats obtenu avec l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II présentaient une coloration blanchâtre inacceptable, alors que ceux enrichis avec l'hydrolysats préparé à l'aide de l'Alcalase avaient une saveur amère très prononcée. Les objectifs de notre travail de recherche ont donc été

définis en vue de résoudre les problèmes rencontrés avec ces deux hydrolysats protéiques, de manière à accroître leur potentiel pour la fortification protéique des jus de fruits.

Le premier objectif de notre étude visait à évaluer l'efficacité d'un traitement enzymatique, à l'aide d'une exopeptidase, pour la désamérisation de l'hydrolysats de protéines du lactosérum préparé à l'aide de l'Alcalase. Il a été démontré, par une évaluation sensorielle de l'amertume, que l'hydrolysats obtenu à l'aide du mélange Alcalase/Flavourzyme était significativement ( $p < 0.05$ ) moins amer que l'hydrolysats obtenu à l'aide de l'Alcalase seule. Cependant, une saveur légèrement amère était encore perceptible dans les jus d'orange fortifiés à partir de cet hydrolysats. Néanmoins, cette amertume de faible intensité pourrait probablement être masquée par le mélange de jus de fruits aux arômes plus prononcés tels la pêche, l'ananas et le fruit de la passion.

Le second objectif de notre étude consistait à évaluer l'effet de l'ultrafiltration, en remplacement du traitement thermique d'inactivation des enzymes, sur le profil peptidique des hydrolysats protéiques et sur les caractéristiques physico-chimiques (solubilité, turbidité, viscosité et stabilité thermique) de jus d'orange additionnés de ces hydrolysats. Dans une première étape, un isolat de protéines du lactosérum (Bipro<sup>®</sup>) a été hydrolysé à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II ou du mélange Alcalase/Flavourzyme, puis ultrafiltré pour stopper la réaction enzymatique mais également pour enrichir les hydrolysats en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da). Les hydrolysats protéiques ainsi obtenus ont ensuite été caractérisés en terme de composition chimique, de profil peptidique et de comportement physico-chimique dans une solution aqueuse, une solution modèle et un jus d'orange.

Les résultats de ces travaux ont démontré que l'ultrafiltration est une méthode efficace pour enrichir les hydrolysats protéiques en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da). En effet, l'arrêt de la réaction d'hydrolyse par ultrafiltration a permis d'augmenter de près de 20% la teneur des hydrolysats en peptides de petites tailles (<5000 da). Par contre,

ce traitement a pour effet d'augmenter leur teneur en sels à 5-9%, ce qui demeure très acceptable pour le domaine alimentaire.

Il a aussi été démontré que l'ultrafiltration des hydrolysats obtenus à l'aide de l'Enzeco<sup>®</sup> bacterial protease II et du mélange Alcalase/Flavourzyme permet d'améliorer leur solubilité dans le jus d'orange. En effet, les hydrolysats ultrafiltrés présentent des valeurs de solubilité dans le jus d'orange supérieures à 91%, comparativement à des valeurs de ~67% pour les hydrolysats désactivés par traitement thermique. En raison de cette amélioration de la solubilité, ces ingrédients donnent des solutions moins turbides et moins visqueuses que celles préparées à partir des hydrolysats traités thermiquement et ce, pour les quatre cotes protéiques étudiées (16, 20, 24 et 28). La stabilité thermique des ingrédients hydrolysés a aussi été améliorée par l'ultrafiltration, leur solubilité dans le jus d'orange demeurant supérieure à 94% suivant l'application de deux traitements thermiques sévères (100°C/7 min; 86°C/17 sec). Enfin, la coloration des jus d'orange fortifiés à l'aide des hydrolysats ultrafiltrés est très peu modifiée et aucun dépôt n'est visible dans les jus fortifiés à l'aide de ces hydrolysats.

Les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux ont donc permis de confirmer les hypothèses de départ. En effet, il a été possible de réduire l'amertume de l'hydrolysat préparé à l'aide de l'Alcalase via l'ajout d'une exopeptidase, soit la Flavourzyme. Enfin, l'ultrafiltration s'est révélée une méthode efficace pour augmenter la teneur des hydrolysats en peptides de faibles poids moléculaires (<5000 da) et pour améliorer leur solubilité dans le jus d'orange, même après l'application d'un traitement thermique reproduisant les conditions de pasteurisation industrielle des jus de fruits.

Malgré la confirmation des hypothèses de départ et l'atteinte des objectifs, deux problèmes ont été observés en cours d'expérimentation et devront être résolus avant la mise à l'échelle du procédé de fabrication des hydrolysats enzymatiques. Le premier problème, mentionné précédemment, est celui de la saveur légèrement amère de l'hydrolysat obtenu à l'aide du mélange Alcalase/Flavourzyme. Pour cet ingrédient, le problème de saveur pourrait être

solutionné par un ajustement de la formulation du jus, avec l'utilisation d'un mélange de fruits aux arômes prononcés en vue de masquer l'amertume.

Le deuxième problème a été rencontré au cours de l'ultrafiltration des hydrolysats, lesquels avaient tendance à gélifier en fonction du facteur de concentration. Soulignons que les membranes d'ultrafiltration utilisées dans le cadre de ces travaux étaient de type «fibre creuse», alors que des membranes de type «spirale» sont généralement utilisées en industrie. La turbulence développée dans ces membranes étant beaucoup plus élevée que celle prévalant dans les fibres creuses, il est possible que le changement de configuration des membranes puisse résoudre le problème de gélification. Par ailleurs, les systèmes industriels de pompage sont plus efficaces que ceux utilisés pour ces travaux et pourraient donc réduire les risques de gélification des solutions en cours d'ultrafiltration. Enfin, il serait possible de réduire la teneur en protéines des solutions afin d'éviter leur gélification en cours de concentration, mais cette approche aurait pour conséquence de réduire l'efficacité du séchage (atomisation) des ingrédients hydrolysés.

Un dernier point à souligner à la suite de ce travail est la nécessité d'étudier le mécanisme de gélification en cours d'hydrolyse, lequel a été observé dans le cas des hydrolysats préparés à l'aide de l'Alcalase. Bien que cette enzyme soit reconnue pour donner des hydrolysats en mesure de gélifier sous certaines conditions, aucun travail de la littérature ne mentionne la gélification de ce type d'hydrolysat en cours d'hydrolyse et à des valeurs élevées de degré d'hydrolyse. Il serait donc intéressant d'étudier ce phénomène afin d'identifier les facteurs responsables de la formation d'un gel à faible température à partir de mélanges peptidiques de poids moléculaires relativement faible.

**BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE**

- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by protease k digestion. *J. Dairy Sci.*, 81: 3131-3138.
- Adachi, S., Kimura, Y., Murakami, K., Matsuno, R., Yogoshi, H. (1991). Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 925-932.
- Adler-Nissen, J. (1976). Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 24(6): 1090-1094.
- Adler-Nissen, J. (1977). Enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochem.*, 12(6): 18.
- Adler-Nissen, J. (1984). Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34B: 215-222.
- Adler-Nissen, J. (1986a). Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publ., New York, pp. 18-23, 32.
- Adler-Nissen, J. (1986b). Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. In: Protein tailoring for food and medical uses. R.E. Feeney et J.R. Whitaker (eds), Marcel Dekker Inc., New York, chap. 4, pp.97-122.
- Aguilera, J.M. (1995). Gelation of whey proteins. *Food Technol.*, 49(10): 83-89.
- Aimutis, W.R. (1998). Improved functional dairy components for health. Concentrated and dried milk whey proteins. Symposium March 30-31, San Francisco.
- Anson, M.L., Mirsky, A.E. (1932). The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 16: 59-63.
- Barbeau, J., Gauthier, S.F., Pouliot, Y. (1996). Thermal stabilization of  $\beta$ -lactoglobulin by whey peptide fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3939-3945.
- Barta, O., V.D., Crisman, M.V., Akers, R.M. (1991). Inhibition of lymphocyte blastogenesis by whey. *Am. J. Vet. Res.*, 52: 247-253.
- Bassette, R., Acosta, J.S. (1988). Composition of milk products. In: Fundamentals of dairy chemistry. Wong, N.P. (ed), Van Nostrand Reinhold, New York, p. 39.

- Berner, L.A., O'Donnell, J.A. (1998). Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. *Int. Dairy J.*, 8: 355-362.
- Bounous, G., Baruchel, S., Falutz, J., Gold, P. (1993). Whey proteins as food supplements in HIV-seropositive individuals. *G. Clin. Invest. Med.*, 16: 204-209.
- Boye, J.I., Alli, I., Ismail, A.A., Gibbs, B.F., Konishi, Y. (1995). Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation. *Int. Dairy J.*, 5: 337-353.
- Brew, K., Grobler, J.A. (1992).  $\alpha$ -lactalbumine. In: *Advanced dairy chemistry – 1*. P.F. Fox (ed). Elsevier Applied Science, London and New York., chap. 5, pp. 191-225.
- Bridger, J.C., Brown, J.F. (1981). Development of immunity to porcine rotavirus in piglets protected from disease by bovine colostrum. *Infect. Immun.*, 31: 906-910.
- Brüssow, H., Hilpert, H., Walther, I., Sidoti, J., Mietens, C., Bachmann, P. (1987). Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile rotavirus gastro enteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 982-986.
- Burg, J.C. (1998). High-energy beverages: genie in the bottle. *Food Product Design*, 8(3): 115-142.
- Burke, C. (1997). Functional foods market in Japan. *IFI*, no 4: 33-35.
- Burn, D. (1995). Proteins: Ingredient choice for the nineties. *Food in Canada*, avril: 48-56.
- Burrington, K.J. (1998a). More than just milk. *Food Product Design*, 7(10): 91-111.
- Burrington, K.J. (1998b). Winning wheys. *Prepared Foods*, 167(7): 83-89.
- Cheftel, J.C., Lorient, D. (1982). Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Le Lait*, 62: 435-483.
- Chen, S.X., Swaisgood, H.E., Foegeding, E.A. (1994). Gelation of  $\beta$ -lactoglobulin treated with limited proteolysis by immobilized trypsin. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 234-239.
- Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C., Nicolas, M.G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.*, 36(5): 883-892.
- Chobert, J.M., Briand, L., Guéguen, J., Popineau, Y., Larré, C., Haertlé, T. (1996). Recent advances in enzymatic modifications of food proteins for improving their functional properties. *Nahrung*, 40(4): 177-182.

- Cogan, U., Moshe, M., Mokady, S. (1981). Debittering and nutritional upgrading of enzymatic casein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.*, 32: 459-466.
- Cordle, C.T. (1994). Control of food allergies using protein hydrolysates. *Food Technol.*, 48(10): 72-76.
- Creamer, L.K., Parry, D.A.D., Malcom, G.N. (1983). Secondary structure of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 227(1): 98-105.
- Creamer, L.K., MacGibbon, A.K.H. (1996). Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *Int. Dairy J.* 6(6): 539-568.
- Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides and proteins. In: *Food chemistry*. Owen Fennema (ed), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 321-429.
- de Wit, J.N., Hontelez-Backx, E. (1981). Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum: conséquences des traitements thermiques. *La Technologie Laitière*, 952 (mars): 19-22.
- de Wit, J.N., Klarenbeek, G. (1981). A differential scanning calorimetric study of the thermal behaviour of bovine  $\beta$ -lactoglobulin at temperature up to 160°C. *J. Dairy Res.*, 48: 293-302.
- de Wit, J.N., Klarenbeek, G., Adamse, M. (1986). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effets of processing history and composition. *Neth. Milk Dairy J.*, 40: 41-46.
- de Wit, J.N. (1989a). Functional properties of whey proteins. In: *Development in Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), Elsevier Science Publ., London and New York, chap 7, pp. 285-322.
- de Wit, J.N. (1989b). The use of whey protein products. In: *Development in Dairy Chemistry*. P.F. Fox (ed), Elsevier Science Publ., London and New York, chap 8, pp. 323-345.
- de Wit, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.*, 81(3): 597-608.
- Dibley, G. (1997). Harnessing the nutritional power of milk. *Proc. Nutr. Soc. NZ.*, 22(20): 150-159.
- Ena, J.M., Van Beresteijn, E.C.H., Robben A.J.P.M., Schmidt, D.G. (1995). Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatin combination. *J. Food Sci.*, 60(1): 104-110, 116.

Evans, E.W. (1982). Uses of milk proteins in formulated foods. In: *Developments in food proteins – 1*. B.J.F. Hudson (ed), Applied Science Publ., London and New Jersey, chap. 4, pp. 131-169.

FAO/WHO/UNU (1985). Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. World Health Organization Technical Rep. Ser. 724, WHO, Geneva.

Fares, K., Landy, P., Guillard, R., Voilley, A. (1998). Physicochemical interactions between aroma compounds and milk proteins: effects of water and protein modification. *J. Dairy Sci.*, 81(1): 82-91.

Feeney, R.E., Yamasaki, R.B., Geoghegan, K.F. (1982). Chemical modification of proteins: An overview. In: *Modification of proteins: Foods, nutritional, and pharmacological aspects*. Robert E. Feeney et John R. Whitaker (eds), chap. 1, pp. 1-55.

Fox, P.F., Morissey, P.A., Mulvihill, D.M. (1982). Chemical and enzymatic modification of food proteins. In: *Developements in food proteins – 1*. B.J.F. Hudson (ed), Applied Science Publ., London and New Jersey, chap. 1, pp. 1-60.

Frøkjær, S. (1994). Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, 48(10): 86-88.

Galani, D., Owusu Apenten, R.K. (1996). The effect of heat on whey proteins. *Food Sci. Technol. Today*, 10(3): 163-168.

Gallagher, J., Kanekanian, A.D., Evans, E.P. (1994). Debittering of  $\alpha$ -casein by fungal peptidase. In: *Biochemistry of milk products*. A.T. Andrews et J. Varlet (eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 143-151.

Gandhi, D.N. (1989). Whey utilization for beverages production. *Indian Dairyman*, 41(1): 35-37.

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(6): 491-510.

Gauthier, S.F. (1996). Les nutraceutiques d'origine laitière. Rapport de sabbatique. Université Laval, Québec, Canada, 184 p.

Gauthier, S., Paquin, P., Pouliot, Y., Turgeon, S. (1993). Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 76(1): 321-328.



- Ge, S.-J., Zhang, L.-X. (1996). The immobilized porcine pancreatic exopeptidases and its application in casein hydrolysates debittering. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 59: 159-165.
- Giese, J. (1994). Proteins as ingredients: types, functions, applications. *Food Technol.*, 48(10): 50-60.
- Giese, J. (1995). Development in beverage additives. *Food Technol.*, 49(9): 64-72.
- Gobbetti, M., Cossignani, L., Somonetti, M.S., Damiani, P. (1995). Effect of the aminopeptidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 on synthetic bitter peptides, bitter hydrolysate of UHT milk proteins and on the ripening of Italian Caciotta type cheese. *Le Lait*, 75: 169-179.
- Godfrey, T. (1996). Protein modification. In: *Industrial Enzymology*. Godfrey, T. et West, S. (eds), The MacMillan Press Ltd, chap. 2.18, pp. 303-325.
- Goff, H.D., Hill, A.R. (1993). Chemistry and Physics. In: *Dairy Science and Technology Handbook – 1*. VCM Publishers Inc., chap. 1, pp. 1-63.
- Gonzalez-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M.P., Guadix, E. M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, 44(4): 529-532.
- Graham, D.E., Phillips, M.C. (1979). Proteins at liquid interfaces. 1. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *J. Colloid Interface Sci.*, 70(3): 403-414.
- Grasset, E., Bovetto, L. (1993). Nutrition entérale: technologie des préparations nutritives. Dans: *Traité de Nutrition Pédiatrique*. Maloine (ed), Paris, chap. 25.3, pp. 957-968.
- Halwalkar, V.R., Ma, C.Y. (1990). Study of thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis of foods. Elsevier Science Publ., New York, pp. 16-50.
- Hambling, S.G., McAlpine, A.S., Sawyer, L. (1992).  $\beta$ -lactoglobulin. In: *Advanced Dairy Chemistry – 1*. P.F. Fox (ed), Elsevier Applied Science, London and New York, chap. 4, pp. 141-179.
- Hambraeus, L. (1992). Nutritional aspects of milk proteins. In: *Advanced Dairy Chemistry – 1*. P.F. Fox (ed), Elsevier Applied Science, London and New York, chap. 11, pp. 457-490.
- Haque, Z.U. (1993). Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: A review. *J. Dairy Sci.*, 76(1): 311-320.
- Hasler, C.M. (1998). Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol.*, 52(11): 63-70.

- Helbig, N.B., Ho, L., Christy, G.E., Nakai, S. (1980). Debittering of skim milk hydrolysates by adsorption for incorporation into acidic beverages. *J. Food Sci.*, 45: 331-335.
- Hermansson, A.M. (1973). Technical Report 2, Chemical Center, Lund.
- Hervé, M. (1997). Vers des formulations plus naturelles. *Process*, no 1125: 42-43.
- Hilliam, M. (1998). The market for functional foods. *Int. Dairy J.*, 8: 349-353.
- Hilpert, H., Brüssow, H., Mietsen, C., Sidoti, J., Herner, L., Werchau, H. (1987). Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus gastro enteritis in infants. *J. Infect. Dis.*, 156, 158-166.
- Hilpert, H., Gerber, H., Amster, H., Pahud, J.J., Ballabriga, A., Arcalis, L., Farriaux, F., de Peyer, E., Nussle, D. (1977). Bovine milk immunoglobulins (Ig), their possible utilization in industrially prepared infant's milk formula. In: *Food and Immunology*. Hambraeus, L., Hanson, L.A. et MacFarlane, H. (eds), Almquist et Wiksell International, Stockholm, Sweden, pp. 182-196.
- Hoffman, M. (1997).  $\beta$ -lactoglobulin: denaturation and aggregation. Thèse de l'Université d'Utrecht, Pays-Bas.
- Huffman, L.M. (1996). Processing whey protein for use as a food ingredient. *Food Technol.*, 50(2): 49-52.
- Ishibashi, N. (1987). Bitterness of leucine-containing peptides. *Agric. Biol. Chem.*, 51: 2389-2394.
- Ishibashi, N., Ono, I., Kato, K., Shigenaga, T., Shinoda, I., Okai, H., Fukui, S. (1988). Role of the hydrophobic amino acid residue in the bitterness of peptides. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 91-94.
- Izawa, N., Tokuyasu, K., Hayashi, K. (1997a). Debittering of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. *J. Agric. Food Chem.*, 45(3): 543-545.
- Izawa, N., Ishikawa, S., Tanokura, T., Ohta, K., Hayashi, K. (1997b). Purification and characterisation of *Aeromonas caviae* aminopeptidase possessing debittering activity. *J. Agric. Food Chem.*, 45(12): 4897-4902.
- Jelen, P., Curries, R., Kadis, V.W. (1987). Compositional analysis of commercial whey drinks. *J. Dairy Sci.*, 70: 892-895.
- Jelen, P. (1992). Whey cheeses and beverages. In: *Whey and lactose processing*. J.G. Zadow (ed), Elsevier Applied Science, London and New York, chap. 5, pp. 157-192.
- Jost, R., Monti, J.C. (1982). Émulateurs peptidiques obtenus par l'hydrolyse enzymatique partielle de la protéine sérique du lait. *Le Lait*, 62: 521-530.

- Jost, R., Monti, J.C., Pahud, J.J. (1987). Whey protein allergenicity and its reduction by technological means. *Food Technol.*, 41(10): 118-121.
- Ju, Z.Y., Kilara, A. (1998). Gelation of hydrolysates of whey protein isolate induced by heat, protease, salts and acid. *Int. Dairy J.* 8: 303-309.
- Ju, Z. Y., Otte, J., Madsen, J. S., Qvist, K. B. (1995). Effects of limited proteolysis on gelation and gel properties of whey protein isolate. *J. Dairy Sci.*, 78: 2119-2128.
- Ju, Z. Y., Otte, J., Zakora, M., Qvist, K. B. (1997). Enzyme-induced gelation of whey proteins: effect of protein denaturation. *Int. Dairy J.*, 7: 71-78.
- Juto, S.S., Ogra, P.L. (1978). Immunologic aspects of human colostrum and milk-II. Characteristics of lymphocyte reactivity and distribution of E-rosette forming cells at different times after onset of lactation. *J. Pediatrics*, 92: 550-555.
- Khanna, R.S., Gupta, V.K. (1996). Process optimisation for the enzymatic production of buffalo milk casein hydrolysate. *Indian J. Dairy Sci.*, 49(6): 386-397.
- Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 13(4): 219-263.
- Kinsella, J.E. (1981). Functional properties of food proteins. Possible relationship between structure and function in foams. *Food Chem.*, 7: 273-288.
- Kinsella, J.E. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 21(3): 197-262.
- Kinsella, J.E. (1988). Protein modification: effects on functional properties and digestibility. In: *Milk proteins: nutritional clinical functional and technological aspects*. Barth, C.A. et Schlimme, E. (eds), Springer-Verlag, New York, p. 1988.
- Kinsella, J.E., Whitehead, D.M., Brady, J., Bringe, N.A. (1989). Milk protein: possible relationship of structure and function. In: *Developments in Dairy Chemistry – 4*. Elsevier Applied Science, London and New York, chap. 2, pp. 55-95.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P., Tupasela, T. (1998). The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. *Agric. Food Sci. Finland*, 7(2): 283-296.
- Kubomura, K. (1998). Japan redefines functional foods. *Prepared Foods*, 167(5): 129-135.
- Lahl, W.J., Braun, S.D. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, 48(10): 68-71.

- Lakkis, J., Villota, R. (1992). Comparative performance of chemically and enzymatically modified whey proteins. *Food Chemistry*, 4:93-105.
- Lee, S.H., Morr, C.V., Ha, E.Y.W. (1992). Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. *J. Food Sci.*, 57: 1210-1213.
- Lemieux, L., Simard, R.E. (1991). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Le Lait*, 72: 335-382.
- Lieske, B. Konrad, G. (1996). Physico-chemical and functional properties of whey protein as affected by limited papain proteolysis and selective ultrafiltration. *Int. Dairy J.*, 6(1): 13-31.
- Lin, S.-B., Nelles, L.P., Cordle, C.T., Thomas, R.L. (1997). Debittering casein hydrolysates with octadecyl-siloxane (C18) columns. *J. Food Sci.*, 62(4): 665-670.
- Lovsin-Kukman, I., Zelenik-Blatnik, M., Abram, V. (1996). Bitterness intensity of soybean protein hydrolysates - chemical and organoleptic characterization. *Z Lebensm Unters Forsch*, 203(3): 272-276.
- Lubbers, S., Landy, P., Voiley, A. (1998). Retention and release of aroma compounds in foods containing proteins. *Food Technol.*, 52(5): 68-74, 208-214.
- Ma, C.-Y., Amantea, G.F., Nakai, S. (1983). Production of nonbitter, desalted milk hydrolysate for fortification of soft drinks and fruit juices. *J. Food Sci.*, 48(3): 897-899.
- Mahmoud, M.I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.*, 48(10): 89-95.
- Mangino, M.E. (1992). Whey and lactose processing: Properties of whey protein concentrates. J.G. Zadow (ed), Elsevier Applied Science, London and New York, chap. 7, pp. 231-270.
- Matoba, T., Hata, T. (1972). Relationship between bitterness of peptides and their chemical structure. *Agric. Biol. Chem.*, 36(8):1423-1431.
- McDonnell, M., Fitzgerald, R., Fhaolain, I.N., Jennings, V., O'Cuinn, G. (1997). Purification and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *J. Dairy Research*, 64: 399-407.
- McKenzie, H.A. (1971).  $\beta$ -lactoglobulin. In: Milk proteins: Chemistry and molecular biology - 2. H.A. McKenzie (ed), Academic Press Publ., New York, pp. 257-330.

- McKenzie, H.A., Ralston, G.B., Shaw, D.C. (1972). Location of sulfhydryl and disulfide groups in bovine  $\beta$ -lactoglobulin and effects of urea. *Biochemistry*, 11: 4539-4547.
- Michalek, S.M., Gregory, R.L., Harmon, C.C., Katz, J., Richardson, G.J., Hilton, T., Filler, S.J., McGhee, J.R. (1987). Protection of gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with bovine milk antibodies to streptococcus mutant. *Infect. Immun.*, 55: 2341-2347.
- Minagawa, E., Kaminogawa, S., Tsukasaki, F., Yamauchi, K. (1989). Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by Aminopeptidase T. *J. Food Sci.*, 54(5): 1225-1229.
- Morr, C.V. (1989). Whey proteins: manufacture. In: *Development in Dairy Chemistry – 4*. P.F. Fox (ed), Elsevier Science Publ., London and New York, chap 6, pp. 245-283.
- 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.
- Motion, R.L. (1992). Hydrolysates of milk proteins. *Proc. Nutr. Soc. NZ.*, 17:56-63.
- Mullally, M.M., Meisel, H., FitzGerald, R.J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a trypsin fragment of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *FEBS letters* 402: 99-101.
- Mulvihill, D.M. (1994). Functional milk protein products. In: *Biochemistry of milk product*. A.T. Andrew et J. Varley (eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 94-113.
- Nakai, S., Li-Chan, E. (1989). Chemical and enzymatic modification of milk proteins. In: *Development in Dairy Chemistry – 4*. P.F. Fox (ed), Elsevier Science Publ., London and New York, chap 9, pp. 347-377.
- Nakamura, T., Syukunobe, Y., Sakurai, T., Idota, T. (1993a). Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. *Milchwissenschaft*, 48(1): 11-14.
- Nakamura, T., Sado, H., Syukunobe, Y., Hirota, T. (1993b). Antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by combination of two proteases. *Milchwissenschaft*, 48(12): 667-670.
- Ney, K.H. (1979). Bitterness of peptides: Amino acid composition and chain length. In: *Food Taste Chemistry*. ACS Symp. Ser. 115: 149-173. American Chemical Society, Honolulu.
- O'Donnell, C.D. (1998). From regs to riches. *Prepared Foods*, 167(7): 52-58.

- Ohr, L.M. (1997). Fortifying for the health of it. *Prepared Foods*, 166(12): 55-60.
- Ohr, L.M. (1998). Avoiding fortification fallout. *Prepared Foods*, 167(2): 43-48.
- Otte, J., Ju, Z.Y., Faergemand, M., Lomholt, S. B., Qvist, K. B. (1996a). Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins. *J. Food Sci.*, 61(5): 911-915, 923.
- Otte, J., Ju, Z.Y., Skriver, A., Qvist, K. B. (1996b). Effect of limited proteolysis on the microstructure of heat-induced whey proteins gels at varying pH. *J. Dairy Sci.*, 79: 782-790.
- Otte, J., Lomholt, S. B., Ipsen, R., Stapelfeldt, H., Bukrinsky, J. T., Qvist, K. B. (1997). Aggregate formation during hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin with a glu and asp specific protease from *Bacillus licheniformis*. *J. Agric. Food Chem.*, 45(12): 4889-4896.
- Panyam, D., Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Foods Sci. Technol.*, 7(4): 120-125.
- Paquin, P., Gauthier, S. (1995). Branle-bas de combat In l'industrie alimentaire. Les nutraceutiques arrivent. *Interface*, novembre-décembre, pp. 26-33.
- 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: 383-385.
- Pawlett, D., Bruce, G. (1996). Debittering of protein hydrolysate. In: *Industrial Enzymology*. Godfrey, T. et West, S. (eds), The MacMillan Press Ltd, New York, chap. 2.9, pp. 179-185.
- Pearce, R.J. (1989). Thermal denaturation of whey protein. *IDF Bulletin*, 238: 17-23.
- Pedersen, B. (1994). Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technol.*, 48(10): 96-98.
- Pessen, H., Purcell, J.M., Farrell Jr, H.M. (1985). Proton relaxation rates in water in dilute solutions of  $\beta$ -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochem. Biophys. Acta*, 828: 1-12.
- Phillips, M.C. (1981). Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. *Food Technol.*, 35: 50-51, 54-57.
- Platzman, A. (1998). Senior-level sustenance. *Food Product Design*, 7(10): 17-18.
- Potter, D. (1990). Functional foods – a major opportunity for the dairy industry ? *Dairy Ind. Int.*, 55(6): 16-17.

- Puyol, P., Perez, M.D., Mata, L., Ena, J.M., Calvo, M. (1993). Effect of retinol and fatty acid binding by bovine  $\beta$ -lactoglobulin on its resistance to trypsin digestion. *Int. Dairy J.*, 3: 589-597.
- Puyol, P., Perez, M.D., Peiro, J.M., Calvo, M. (1994). Effect of binding of retinol and palmitic acid binding by bovine  $\beta$ -lactoglobulin on its resistance to thermal denaturation. *J. Dairy Sci.*, 77: 1494-1502.
- Renard, D. (1994). Études de l'agrégation et de la gélification des protéines globulaires: application à la  $\beta$ -lactoglobuline. Thèse Université de Nantes, France.
- Robin, O., Turgeon, S., Paquin, P. (1993). Functional properties of milk proteins. In: *Dairy Science and Technology Handbook – 1*. Y.H. Hui (ed), VCH Publishers Inc., chap. 4, pp. 289-329.
- Roessler, E.B., Pangborn, R.M., Sidel, J.L., Stone, H. (1978). Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo-trio and triangle tests. *J. Food Sci.*, 43: 940-943, 947.
- Rolland, M. (1999). Mise au point d'un hydrolysate enzymatique de protéines de lactosérum pour la fortification protéique d'un jus d'orange. Mémoire Université Laval, Québec, Canada.
- Rouanet, J.M., Zambonino Infante, J.L., Caporiccio, B., Pejoan, C. (1990). Nutritional value and intestinal effects of dipeptides and tripeptides. *Ann. Nutr. Metab.*, 34: 175-182.
- Roudot-Algaron, F. (1996). Le goût des acides aminés, des peptides et des protéines: exemple de peptides sapides In les hydrolysats de caséines. *Le Lait*, 76: 313-348.
- Saif, L.J., Redman, D.R., Smith, K.L., Theil, K.W. (1983). Passive immunity to bovine rotavirus in new born calves fed with colostrum supplements from immunized or non-immunized cows. *Infect. Immun.*, 41: 1118-1131.
- Samant, S.K., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., Rege, D.V. (1993). Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 28: 547-562.
- Schmidt, D.G., Poll, J.K. (1991). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, 45: 225-240.
- Schmild, M.K., Taylor, S.L., Nordlee, J.A. (1994). Use of hydrolysate-base products in special medical diets In: *Overview: outstanding symposia in food science and technology*. *Food Technol.*, 48: 77-85.

- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Hardy, J. (1998). Structure and rethnofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Cric. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38(8): 689-753.
- Shimizu, M., Lee, S.W., Kaminogawa, S., Yamauchi, K. (1981). Emulsifying properties of an N-terminal peptide obtained from tryptic hydrolysate of  $\alpha_{s1}$ -casein. *J. Food Sci.*, 49: 1117-1120.
- Sienkiewicz, T., Riedel, C.-L. (1990). *Whey and whey utilization*. Verlag Th. Mann Publ., Germany, pp.164-189.
- Singh, A.M., Dalgleish, D.G. (1998). The emulsifying properties of hydrolysates of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 81(4): 918-924.
- Slattery, H., Fitzgerald, R.J. (1998). Functional properties and bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a *Bacillus* proteinase. *J. Food Sci.*, 63(3): 418-422.
- Stanley, D.W. (1981). Non-bitter protein hydrolysates. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 14(1): 49-52.
- Stephen, A.M. (1998). Regulatory aspects of functional products. In: *Functional foods. Biochemical and processing aspects*. G. Mazza (ed), Technomic Publishing Co. Inc., chap. 13, pp. 403-437.
- Swaigood, H.E. (1982). Chemistry of milk proteins. In: *Developments in dairy chemistry – 1*. P.F. Fox (ed), Applied Science Publ., New York. pp. 1-61.
- Swartz, M.L. (1995). Milk proteins and hydrolysates in nutritional foods. *Food Marketing & Technol.*, 9(2): 4-12.
- Syrbe, A., Bauer, W.J., Klostermeyer, H. (1998). Polymer science concepts in dairy systems- An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *Int. Dairy J.*, 8: 179-193.
- Tacket, C.O., Losonsky, G., Link, H., Hoang, Y., Guersy, P., Hilpert, H., Levine, M.M. (1988). Protection of milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *New Enge. J. Med.*, 318: 1240-1243.
- Tanford, C., Brunville, L.G., Nozaki, Y. (1959). The reversible transformation of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 7.5. *J. Am. Chem. Soc.*, 81: 4032-4036.
- Tolstoguzov, V.B. (1997). Protein-polysaccharide interactions. In: *Food proteins and their applications*. S. Damodaran, Paraf, A. (eds), Marcel Dekker, Inc., pp. 171-198.
- Tseng, E., Potter, S.M., Picciano, M.F. (1990). Dietary protein source and plasma lipid profiles of infants. *Pediatrics*, 85: 548-552.



- Tuohy, J.J., Fitzgerald, A., Nash, P. (1988). Utilization of whey as a beverage. New whey-based fruit juice drink to be launched in Ireland. *Farm Food Res.*, 19(4): 8-10.
- 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 peptides fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 673-676.
- Turgeon, S.L., Gauthier, S.F., Paquin, P. (1992). Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. *J. Food Sci.*, 57(3): 601-604, 634.
- Turgeon, S.L., Sanchez, C., Gauthier, S.F., Paquin, P. (1995). Study of the stability and rheological properties of whey peptides fractions based salad dressing. *Int. Dairy J.*, 6: 645-658.
- Umetsu, H., Matsuoka, H., Ichishima, E. (1983). Debittering mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxypeptidase. *J. Agri. Food Chem.*, 31: 50-53.
- Umetsu, H., Ichishima, E. (1988). Mechanism of digestion of bitter peptides from soybean protein by wheat carboxypeptidase. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 35: 440-447.
- van Moursel, L. (1997). Improving calcium and iron bioavailability. *Int. Food Ingredients*, 4: 44-46.
- Vegarud, G.E., Svenning, C., Molland, T., Langsrud, T. (1991). Enzymatic hydrolysis of milk proteins improved functional properties. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 56(4a): 1649-1653.
- Visser, S., Schmidt, D.G., Siezen, R.J. (1993). Enzymatic hydrolysis of milk proteins: some fundamental and practical aspects. In: *Developing agricultural biotechnology in the Netherlands*. Vuijk-DH et Dekkers-JJ (eds), Plas-HC-van-der, chap. 5, pp. 207-213.
- Vojdani, F., Whitaker, J.R. (1994). Chemical and enzymatic modification of proteins for improved functionality. In: *Protein functionality in food systems*. Marcel Dekker Inc. (ed), New York, chap. 9, pp. 262-309.
- Watson, D.L. (1990). Immunological activity of factors in colostrum and milk. In: *Joint convention papers, Gold coast, QLD, 6<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> May*, Halais, C., Deeth, H., Fedrick, I., Jehne, C., Leith, G., MacFarlane, J. et Paroz, P. (eds). The QLD branch of the Australian and New Zealand Institutes of Food Science and Technology Ltd, pp. 81-83.

- Whitaker, J.R., Puigserver, A.J. (1982). Fundamentals and applications of enzymatic modifications of proteins: An overview. In: *Modification of proteins: Foods, nutritional, and pharmacological aspects*. Robert E. Feeney et John R. Whitaker (eds), chap. 2, pp. 57-87.
- Wong, C.W., Watson, D.L. (1995). Immuno modulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J. Dairy Res.*, 62(2): 359-368.
- Wu, W.U., Hettiarachchy, N.S., Qi, M. (1998). Hydrophobicity, solubility and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *JAOCS*, 75(7): 845-850.
- Xiong, Y.L. (1992). Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins. *J. Agric. Food. Chem.*, 40(3): 380-384.
- Yeom, H.W., Kim, K.S., Rhee, J.S. (1994). Soy protein hydrolysate debittering by lysine-acetylation. *J. Food Sci.*, 59(5): 1123-1126.
- Young, J.N. (1996). *Functional Foods. Strategies for successful product development*. FT Management Report.
- Zhang, X., Beynen, A.C. (1993). Lowering effect of dietary milk-whey proteins v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *Brit. J. Nutr.*, 70(1): 139-146.
- Ziegler, F., Ollivier, J.M., Cynober, L., Masini, J.P., Coudray-Lucas, C., Levy, E., Goboudeau, J. (1990). Efficiency of enteral nitrogen support in surgical patients: small peptides v non-degraded proteins. *Gut* 31: 1277-1283.