



HAL
open science

Extraction et protéolyse de napines de tourteau de colza : influence de l'état structural de la protéine sur la cinétique de protéolyse, la composition et les fonctionnalités des hydrolysats

Claudia Nioi

► **To cite this version:**

Claudia Nioi. Extraction et protéolyse de napines de tourteau de colza : influence de l'état structural de la protéine sur la cinétique de protéolyse, la composition et les fonctionnalités des hydrolysats. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0074 . tel-01749848

HAL Id: tel-01749848

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749848v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE (UL)

Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)
Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

THESE

Présentée à l'Université de Lorraine par

Claudia NIOI

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

EXTRACTION ET PROTEOLYSE DE NAPINES DE TOURTEAU DE COLZA : INFLUENCE DE
L'ETAT STRUCTURAL DE LA PROTEINE SUR LA CINETIQUE DE PROTEOLYSE, LA
COMPOSITION ET LES FONCTIONNALITES DES HYDROLYSATS

Soutenue publiquement le 12 juillet 2013

Membres du jury

Rapporteurs :	Jean-Marc CHOBERT	Directeur de recherche, INRA, BIA, Nantes
	Pascal DHULSTER	Professeur des Universités IUT A, Lille
Examineurs :	Annie MARC	Directeur de recherche, CNRS, LRGP, Nancy
	Jean-Luc SIMON	Directeur R&D, Ingredia Group, Arras
	Ivan MARC	Directeur de recherche, CNRS, LRGP, Nancy
	Romain KAPEL	Maître de conférences, UL, LRGP, Nancy

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements à Jean-Marc Chobert, Pascal Dhulster, Jean-Luc Simon et Annie Marc pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Et puisque la thèse est bien loin d'être un travail solitaire, je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes qui ont contribué à ma formation scientifique et qui ont rendu très agréables ces années de doctorat.

En premier lieu je remercie mon laboratoire d'accueil : le Laboratoire de Réaction et Génie des Procédés (LRGP) de l'Université de Lorraine. J'exprime toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèse, pour lesquels j'éprouve un profond respect. Merci à vous pour la confiance que vous m'avez accordée, pour vos multiples conseils et tout le temps consacré à ce projet de recherche. Je remercie Ivan Marc pour son encadrement, ses critiques constructives, son regard méthodique et sa patience pour me rendre toujours plus rigoureuse. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Romain Kapel pour la qualité de son encadrement et pour m'avoir guidée jour après jours pendant ces quatre ans. Un grand merci pour sa grande disponibilité et pour avoir partagé avec moi sans cesse ses connaissances. Je le remercie aussi pour ses qualités humaines d'écoute et de compréhension, au-delà de la formation professionnelle.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe Bioprocédés-Biomolécules (BioProMo) - Isabelle Chevalot, Annie Marc, Eric Olmos, Stephan Delaunay, Emmanuel Guedon, Laetitia Canabady-Rochelle, Céline Frochot, Fabrice Blanchard, Philippe Arnoux, Eveline Ronat - qui ont su partager leur savoir-faire, les connaissances et leur enthousiasme.

Un merci particulier à mes collègues de la plateforme SVS : Xavier Framboisier, Manu Rondags et Christelle Harscoat, pour leur investissement dans ma thèse et leur gentillesse au quotidien... vous avez rendu si agréable mon environnement de travail ! Merci Arnaud pour avoir été présent tout au long des travaux de purification, pour ta patience et ton soutien en toutes circonstances. D'autre part, un merci particulier aussi à Frantz Fournier, Yann Guiavarc'h et Alexandre Kriznick. Je vous remercie pour vos conseils scientifiques, vos compétences et votre implication dans ma thèse.

J'exprime également ma reconnaissance à l'ensemble des stagiaires qui ont contribué, de près ou de loin, à la récolte de précieux résultats : Julien, Ghali, Carla, Yoana, Remy, et Clément. Votre motivation et la grande quantité de travail apportées à cette thèse ont été d'une utilité plus qu'appréciable.

Je remercie mes collègues et amies : Nadia, Pierrick, Caro, Amel et Kenza ; merci pour les discussions scientifiques et pour votre support, surtout en cette dernière année ! Vous me manquerez beaucoup...mes soirées nancéennes et mes fins de semaines n'auraient pas été si agréables sans vous ! Une pensée aussi pour Amanda, Nohra, Boudur, Laial, Mathilde, Françoise, Florent et Karim ainsi que tous ce qui j'ai pu croiser pendant ces années. Une pensée aussi pour les Nantais: Hanitra, Yvan et Matthieu qui m'ont motivé à démarrer cette thèse.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont entourée durant ces quatre années : Béa, Salima, Pien, Yousef, Enzo. Un grand merci pour vos amitié et soutien. Merci Loïc pour la qualité de tes conseils scientifiques, pour ton soutien, ton énergie et ton écoute. Je remercie aussi mes copines d'Italie ; Alice, Tizi, Maia, Clavi et Marianna dont leur soutien via de nombreuses « cyberconversations » a rendu moins difficile la distance qui me séparait de mon île.

Enfin je voudrais dédier cette thèse à ma famille qui m'a donnée toutes les possibilités de voyager tout en enrichissant mes bagages culturel et professionnel. Un grand merci pour avoir été, où que je puisse me trouver, mon perpétuel rayon de soleil.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1. LE TOURTEAU DE COLZA : ORIGINE ET COMPOSITION	9
2. EXTRACTION ET PURIFICATION DES PROTEINES DE COLZA	22
3. ANALYSE STRUCTURALE DES PROTEINES	28
4. DES PROTEINES AUX PEPTIDES : LE PROCEDE DE PROTEOLYSE	36
5. FONCTIONNALITES DES PEPTIDES	44
6. L'OPTIMISATION	51
MATERIEL ET METHODES	61
1. OBTENTION D'UN ISOLAT DE NAPINES A PARTIR DU TOURTEAU DE COLZA INDUSTRIEL	63
2. ANALYSE STRUCTURALE DE NAPINES EXTRAITES	76
3. PROTEOLYSE ENZYMATIQUE	80
4. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES DE NAPINES ET DES HYDROLYSATS OBTENUS	86
RESULTATS ET DISCUSSION	91
CHAPITRE I : Mise en œuvre d'un procédé d'extraction sélective de napines de tourteau de colza	94
1. INTRODUCTION	95
2. EXTRACTION SELECTIVE DE NAPINES ISSUES D'UN TOURTEAU DE COLZA INDUSTRIEL ET EVALUATION DE LEURS PROPRIETES ANTIFONGIQUES	95
3. OPTIMISATION MULTICRITERES DU PROCEDE D'EXTRACTION SELECTIVE DE NAPINES DE TOURTEAU DE COLZA INDUSTRIEL	117
4. EXTRACTION ET PURIFICATION DE NAPINES A L'ECHELLE PILOTE	135
CHAPITRE II : Influence de l'état structural du substrat sur la protéolyse enzymatique	145
1. INTRODUCTION	147
2. HYDROLYSE EN CONDITION BASIQUE PAR L'ALCALASE [®] 2,4 L	148
3. HYDROLYSE EN CONDITION ACIDE PAR LA PEPSINE	171
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187

Abréviations

ACN : acétonitrile

AE : algorithme évolutionnaire

AMSOL : association de l'industrie des semences de plantes oléoprotéagineuses

BDM : milieu de culture chimiquement défini et sans protéine

BHK : ovaire de bébé hamster

FCCC : face-centered central composite design (plan composite centré)

CF : Concentration factor (facteur de concentration volumique)

CHO : ovaire de hamster chinois

CLBP : chromatographie liquide basse pression

CLBP-ES : chromatographie liquide basse pression d'exclusion stérique

CLHP : chromatographie liquide haute performance

CLHP- EI : chromatographie liquide haute performance d'échange d'ions

CLHP- PI : chromatographie liquide haute performance en phase inversée

DC : dichroïsme circulaire

L-UV : ultra-violet lointain

P-UV : proche ultra-violet

DF : diafiltration

DLS : dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)

DSC : differential scanning calorimetry (calorimétrie différentielle à balayage)

DTT : dithiothréitol

EC : enzyme commission number (commission des enzymes)

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

FAO : food and agricultural organization (organisation de l'agriculture et des aliments)

IFP : institut français du pétrole

n.d. : non déterminé

NF : nanofiltration

OI : osmose inverse

ONIDOL : organisation nationale interprofessionnelle des graines et fruits oléagineux

OPA : orthophtaldialdéhyde

pI : point isoélectrique

PROLEA : filière française des huiles et protéines végétales

PTM : pression transmembranaire

RPMI 1640 : milieu de culture « Roswell park mémorial institute »

RSM : response surface methodology (méthodologie de surface de réponse)

SDS : dodécylsulfate de sodium

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis (électrophorèse sur gel de polyacrilamide en présence de dodécylsulfate de sodium)

TCA : tri-chloroacetic acid (acide trichloroacétique)

TEMED : NNN'N'-tétraméthyl éthylène diamine

TFA : acide trifluoroacétique

TNBS : acide trinitrobenzène sulfonique

UF : ultrafiltration

UV : ultraviolet

Vero : reins de singe vert

Abréviation des acides aminés :

Acides aminés	code à 3 lettres
Alanine	Ala
Arginine	Arg
Acide aspartique	Asp
Cystéine	Cys
Acide glutamique	Glu
Glycine	Gly
Histidine	His
Isoleucine	Ile
Leucine	Leu
Lysine	Lys
Méthionine	Met
Phénylalanine	Phe
Proline	Pro
Sérine	Ser
Thréonine	Thr
Tryptophane	Trp
Tyrosine	Tyr
Valine	Val

NOMENCLATURE

A : consommation d'acide (mL)

$a_{i,j}$, ij : coefficients

B : consommation de base (mL)

C_p : capacité calorifique ($\text{kcal} \cdot \text{C}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

D : dénaturé

DH : degré d'hydrolyse déterminé par la méthode du pH-Stat (%)

DH_0 : azote non protéique soluble présent dans le substrat (%)

DH_{5mn} : degré d'hydrolyse obtenu à 5 mn (%)

DH_{max} : azote non protéique soluble total après hydrolyse (%)

DH_t : azote non protéique à un temps donné (%)

DV : diavolume

E/S : ratio enzyme substrat

E_a : énergie d'activation

FCV : facteur de concentration volumique

F_d : fraction dénaturée

f_N : facteur de conversion Kjeldahl

Gdn,HCl : chlorure de guanidinium

h : nombre de liaisons peptidiques clivées

h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques (meq/g protéines)

k : constante d'équilibre

M_p : masse de protéine (g)

MS : matière sèche ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

map : concentration des napines dans l'extrait ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

mat : concentration des protéines totales dans l'extrait ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

m_{DM} : matière sèche du tourteau ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

MOD : méthode déterministe

MOS : méthode non déterministe

MSR : méthodologie de surface de réponse

MS_t : taux de matière sèche (%)

m_w : poids du tourteau (g)

N : native

N_a : normalité de l'acide (mole)

N_b : normalité de la base (eq/L)
 n_e : taux estimé de napines présentes dans le tourteau
 Q_d : quantité de chaleur absorbée
 R : constante de gaz parfaits ($\text{kcal} \cdot \text{°C}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 S_0 : concentration en protéine (%)
 T : température (°C ou K)
 T_d : température de dénaturation (°C)
 $T_{m1,2}$: température de dénaturation des transitions 1 ou 2 (°C)
 UA : unité Anson
 V : variance
 V_e : volume d'extraction totale (L)
 V_{NaOH} : volume de soude (mL)
 V_o : vitesse initiale ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 X_n : paramètres variables
 Y_n : effets des variables
 Y_p : rendement protéique (%)
 α : degré moyen de dissociation de groupements α -aminés
 ΔC : variation de l'osmolalité (milli osmole)
 ΔC_p : variation de chaleur spécifique ($\text{kcal} \cdot \text{°C}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 ΔH : variation d'enthalpie ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 ΔH_{vH} : variation d'enthalpie de van't Hoff ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 θ : ellipticité (degré)
 λ : longueur d'onde (nm)
 λ_d : longueur d'onde maximale de la protéine à l'état dénaturé (nm)
 λ_{max} : longueur d'onde maximale (nm)
 λ_n : longueur d'onde maximale de la protéine à l'état natif (nm)
 σ^2 : variabilité naturelle
 ω : coefficient osmotique

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Diverses protéines issues d'agro-ressources peuvent être utilisées comme source de peptides bioactifs. Etant potentiellement présents mais inactifs à l'intérieur de la chaîne d'acides aminés qui constitue une protéine, ces peptides doivent tout d'abord en être intégralement extraits pour pouvoir exprimer leur action métabolique ou physiologique ; ces actions sont variées. Il peut s'agir des peptides qui ont des effets dans le système cardiovasculaire (activités antithrombotiques ou antihypertensives) ou dans le système nerveux central (peptides opioïdes), ou bien ayant une application dans le domaine de la sécurité alimentaire et pharmaceutique (activités antimicrobiennes et stimulation de la croissance de cellules eucaryotes et procaryotes). Un autre aspect de leur utilisation est le secteur de l'industrie alimentaire et cosmétologique. De par leurs propriétés moussante et/ou émulsifiante ces peptides peuvent être intégrés pour améliorer la texture des aliments ou pour la formulation de soins de la peau ou des cheveux (Clemente, 2000). A la lumière de ces applications potentielles, il apparaît que les peptides présentent un intérêt essentiel et que l'étude de leur production mérite une attention particulière.

L'hydrolyse enzymatique est une des méthodes les plus répandues pour la production des peptides bioactifs. La variété des peptides libérés, aussi bien quantitative que qualitative, dépend fortement des conditions opératoires de protéolyse, c'est-à-dire de la nature de la protéase (spécificité de coupure), le rapport enzyme/substrat, de la durée de la réaction mais aussi du pH et de la température (T). Ces deux derniers paramètres sont choisis en fonction des propriétés catalytiques de la protéase ; toutefois, ils influencent aussi la structure de la protéine, substrat de la réaction. Or, la génération des peptides bioactifs ne dépend pas seulement de la spécificité de la protéase utilisée mais aussi de l'état structural du substrat et de la capacité de l'enzyme à l'hydrolyser (accessibilité à la différente liaison peptidique clivable). Dans ce contexte la question qui a motivé notre démarche est :

« Peut-on maîtriser l'état structural d'une protéine afin d'agir sur la protéolyse, sa cinétique ainsi que les produits de la réaction, tout en améliorant les performances du procédé ou en faisant apparaître des nouvelles fonctionnalités, notamment au niveau de bioactivités des hydrolysats ? »

<p>Pour répondre à cette question le premier objectif de cette thèse est d'étudier et de mettre en œuvre un procédé extrapolable qui permette d'extraire une protéine cible à partir d'un co-produit agro-bio-sourcé, valorisable, afin de « produire » cette protéine purifiée.</p>
--

Les conditions d'extraction, guidées par des « contingences dites durables », doivent permettre de s'orienter vers un second objectif qui concerne l'étude et la maîtrise de conditions de mise en œuvre de cette protéine. Ceci doit avoir pour but de qualifier et de quantifier l'impact de « conditions de préparation/modification structurale » de cette protéine sur le procédé de protéolyse enzymatique tant au niveau cinétique que de la composition des hydrolysats et de leurs propriétés / fonctionnalités bio-physico-chimiques.

Le choix du type de protéine, considérée comme substrat modèle au cours de cette étude, s'est porté sur les napines ; ce sont des petites protéines de type albumines 2 S, connues pour avoir une activité antimicrobienne. Ces protéines peuvent être extraites de la graine ou du tourteau de colza.

Au cours des vingt-cinq dernières années, la culture de colza n'a cessé de s'étendre, suite à la demande importante en son huile, connue pour ses propriétés en faveur de la santé, notamment la faible teneur en acides gras saturés, sa teneur en ω -3 et son faible rapport ω -6/ ω -3. A côté de la production d'huile alimentaire, un autre débouché assez récent est sa transformation en biodiesel par trans-estérification des acides gras. L'augmentation de la production d'huile à partir de la graine a entraîné une production croissante de son co-produit : le tourteau. Ce dernier, de par sa richesse en protéines (teneur d'environ 45 %), est principalement utilisé en alimentation animale. Toutefois, parmi les protéines qui composent le tourteau, les napines présentent une composition en acides aminés équilibrée, au sens de la nutrition humaine, contenant l'ensemble des acides aminés essentiels. Ainsi, au regard de leur bioactivité connue, de leur petite taille ainsi que de la grande disponibilité du tourteau et de son faible coût (0,28 €/Kg), le choix du substrat protéique d'hydrolyse s'est porté sur les napines de tourteau de colza.

Néanmoins, le facteur limitant l'utilisation des protéines du tourteau dans l'alimentation humaine est dû au fait qu'elles sont associées à des composés antinutritionnels, notamment des polyphénols, difficiles à éliminer et qui modifient leurs propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et sensorielles (Xu et Diosady, 2002).

De ce fait, avant de procéder à l'étude de la protéolyse, la première partie de cette thèse sera consacrée, à la mise au point d'un procédé d'obtention d'un isolat (pureté en protéine égale ou supérieure à 90 %) de napines à partir d'un tourteau de colza industriel.

Pour atteindre ce premier objectif, la démarche sera :

- de réussir à mettre en œuvre un procédé d'extraction sélective des napines, par rapport aux autres protéines de tourteau, notamment les cruciférines, afin de proposer un procédé de purification simple,
- d'extrapoler à l'échelle pilote, le procédé d'extraction et de purification des napines, afin d'augmenter le rendement en protéine produite,
- de valider le potentiel antimicrobien des napines extraites, afin de montrer une voie de valorisation du tourteau dans le secteur de la sécurité alimentaire.

Dans un premier temps, l'action des paramètres les plus influents sur le procédé d'extraction sélective des napines sera analysée et une approche de planification expérimentale multicritère sera mise en place. Les conditions opératoires les plus performantes, selon les critères quantitatifs (quantité de protéine extraite sélectivement, pureté et rendement protéique) et qualitatifs (association polyphénols/protéine), seront sélectionnées pour la production, à l'échelle pilote de laboratoire, d'un stock de napines en vue des expériences futures, nécessaires à l'étude de la protéolyse. La validation du potentiel antimicrobien sera effectuée sur la capacité de la protéine à inhiber la croissance de *Fusarium langsethiae*, champignon filamenteux qui endommage les cultures de céréales.

Vu l'objectif central de ce travail, qui consiste en la maîtrise du procédé de protéolyse enzymatique par un nouveau paramètre de « contrôle », l'état de structuration initiale de la protéine, la deuxième partie de cette thèse sera consacrée à :

- 1) l'étude des conditions de modification de la structure des napines,
- 2) la mise en œuvre du procédé de protéolyse.

Pour développer le premier point, la démarche sera :

- de déterminer les paramètres affectant la stabilité thermique des napines,
- d'évaluer quantitativement la dénaturation des napines à différents couples de pH et T,
- d'établir la « durée d'incubation » (période de temps durant laquelle la protéine seule est placée dans des conditions de pH et T déterminées) comme paramètre de « contrôle » de la dénaturation de la protéine.

Alors, les effets du pH et de la température, sur la stabilité thermique de la protéine, seront évalués par calorimétrie différentielle à balayage. Cette approche permettra de définir les étapes caractérisant le mécanisme de dénaturation des napines. Après avoir identifié les

intervalles de pH et T pour lesquels la protéine présente des états structuraux différents, son niveau de dénaturation au cours du temps sera quantifié par la fluorescence.

L'objectif de la troisième partie sera d'évaluer quantitativement, l'effet de l'état structural initial de la protéine sur la cinétique de protéolyse et, par conséquent, sur la qualité des peptides libérés, afin de faire émerger la « durée d'incubation » comme paramètre de contrôle de la protéolyse enzymatique dirigée.

Pour atteindre ce dernier objectif, la démarche concernera :

- la mise en œuvre du procédé et la quantification de l'effet potentiel du « substrat incubé » sur la cinétique de protéolyse et sur les propriétés physico-chimiques (hydrophobie) des mélanges obtenus,
- la validation des propriétés biologiques et fonctionnelles des hydrolysats générés.

Pour ce faire, des protéolyses du substrat pris dans différents états de structuration (natif et dénaturé), seront mises en œuvre. Leurs cinétiques et le profil chromatographique des mélanges obtenus en C.L.H.P. - phase inversée, seront comparés. Puis, les bioactivités des mélanges libérés seront regardées sur la croissance de certaines cellules animales et de bactéries particulières. Enfin, les propriétés moussantes et émulsifiantes seront analysées.

La démarche globale de cette thèse est résumée dans la figure 1.

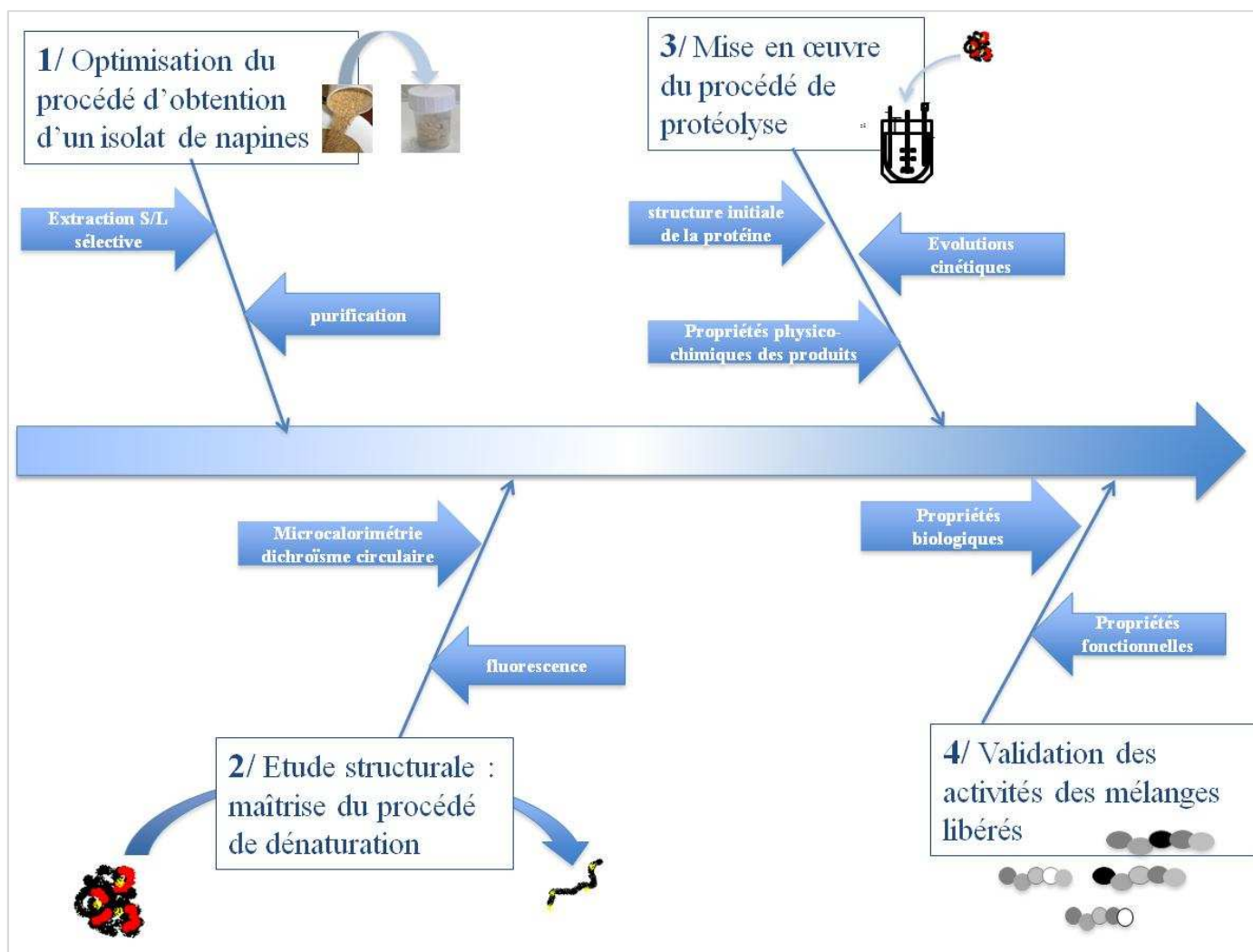


Figure 1. Schéma illustrant la démarche globale de la thèse.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.	LE TOURTEAU DE COLZA : ORIGINE ET COMPOSITION	10
1.1.	Généralités	10
1.2.	Procédé d'extraction d'huile à partir de la graine de colza	11
1.3.	Le tourteau de colza : composition et utilisation	14
1.4.	Les protéines du tourteau de colza	15
1.4.1.	Les cruciférines	16
1.4.2.	Les oléosines	17
1.4.3.	Les napines	17
1.4.4.	Propriétés fonctionnelles des protéines de colza	19
1.5.	Les composés « antinutritionnels »	20
1.5.1.	Les glucosinolates	20
1.5.2.	L'acide phytique	21
1.5.3.	Les polyphénols	22
2.	EXTRACTION ET PURIFICATION DES PROTEINES DE COLZA	23
2.1.	Production d'un isolat protéique	23
2.2.	L'extraction des protéines par solubilisation	24
2.3.	Techniques de précipitation sélective de protéines	25
2.4.	La séparation membranaire	25
2.5.	Récupération des protéines par techniques membranaires	27
2.6.	Méthodes de séparation chromatographique	28
3.	ANALYSE STRUCTURALE DES PROTEINES	29
3.1.	Les différents niveaux de structuration des protéines	29
3.2.	Le dichroïsme circulaire (DC)	30
3.3.	La fluorescence	32
3.4.	La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	33
3.5.	Facteurs impliqués dans la dénaturation des protéines	36
4.	DES PROTEINES AUX PEPTIDES : LE PROCEDE DE PROTEOLYSE ENZYMATIQUE	37
4.1.	Les protéases : définition et classification	38
4.2.	Mécanisme d'actions des enzymes	39
4.3.	Les paramètres affectant l'activité enzymatique	40
4.4.	Mesure de l'activité enzymatique	41
4.5.	Les méthodes de contrôle du procédé de protéolyse enzymatique	41
4.6.	Mise en œuvre du procédé de protéolyse enzymatique	43
4.6.1.	Réacteur discontinu	43
4.6.2.	Réacteur continu	44

4.7.	Procédés de séparation des hydrolysats	44
4.8.	Caractérisation des peptides	45
5.	FONCTIONNALITES DES PEPTIDES	46
5.1.	Propriétés fonctionnelles	47
5.2.	Propriétés sensorielles	48
5.3.	Propriétés nutritionnelles	49
5.4.	Propriétés biologiques	49
6.	L'OPTIMISATION	53
6.1.	Les plans d'expériences	54
6.2.	Méthode des surfaces de réponse (MSR)	54
6.3.	Méthodes d'optimisation	57
6.3.1.	Optimisation multicritère	58
6.3.2.	Domaine de Pareto et algorithmes génético-évolutionnaires	59

1. LE TOURTEAU DE COLZA : ORIGINE ET COMPOSITION

1.1. Généralités

Le colza (*Brassica napus L.*) est une plante ramifiée à fleurs jaunes, appartenant à la famille des crucifères (*Cruciferae*). Il est le produit d'une hybridation naturelle entre le chou (*Brassica oleracea L.*) et la navette (*Brassica campestris L.*). Pour cette raison, il a été appelé *Koolzaad*, qui signifie « semence de chou ». Les fruits de colza appelés siliques, renferment des petites graines noires riches en acides gras insaturés (environ 40-45 %). Ces graines sont utilisées pour la production d'huile. De par sa teneur en huile, le colza, avec le tournesol, représente l'une des trois principales sources d'huile végétale, destinée à l'alimentation humaine et à la production d'agro-carburants. Le colza est aussi constitué de protéines (15-30 %) et de glucides (25-30 %), au même titre que le soja, le tournesol, le coton et l'arachide (Rodrigues *et al.*, 2011). La figure 2 compare la répartition globale de la graine de colza, en ses principaux composants, à celle d'autres sources oléagineuses.

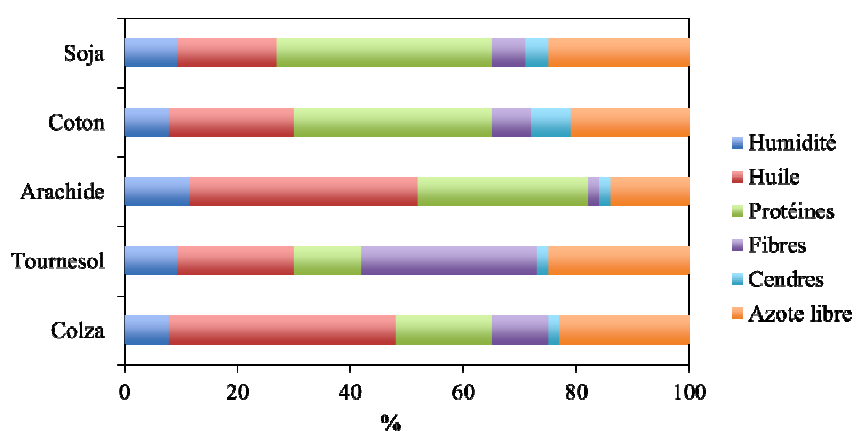


Figure 2. Composition moyenne de quelques plantes oléagineuses (extrait de Yufera, 1998).

Parmi les 3000 variétés de colza existantes, deux sont majoritairement cultivées : celle dite d'hiver et celle de printemps. La première, particulièrement présente en Europe est cultivée pour la récolte de ses graines à partir desquelles est extraite une huile végétale d'usage alimentaire courant (Gunstone, 2001). La seconde, essentiellement retrouvée au Canada, est destinée à l'alimentation animale ou à la production d'engrais vert (Rakow, 2004).

C'est au début des années 60 que la culture de colza s'est développée en France, qui est devenue le premier producteur européen. La productivité de la culture du colza s'est accrue au début des années 70, grâce à des travaux de sélection destinés à améliorer la qualité de ces graines. La première variété de colza (« variété simple zéro ») a été créée par suppression de l'acide érucique (C22:1 Δ 9) en raison de sa toxicité sur la santé humaine. Au Canada une variété appelée « Canola » (CANadian Oil Low Acid), et produisant cet acide en faible quantité a pu être obtenue (Bell, 1993). Une deuxième variété (« variété double zéro ») sans acide érucique, à faible teneur en glucosinolates, composés soufrés responsables des troubles physiologiques chez l'animal et l'homme, a été ensuite produite.

1.2. Procédé d'extraction d'huile à partir de la graine de colza

L'extraction de l'huile à partir des graines de colza se fait en trois étapes essentielles : la trituration, l'extraction et le raffinage (Figure 3). La graine déshuilée constitue le tourteau dont la richesse en protéines l'a destiné à l'alimentation animale.

La trituration permet la libération de l'huile renfermée dans les graines de colza. Cette opération donne, d'une part, le tourteau contenant encore 15 % d'huile et, d'autre part, une huile brute de pression destinée à être raffinée. Cette huile est d'abord extraite par un solvant apolaire (hexane) à une température légèrement inférieure à son point d'ébullition. Le mélange solvant-huile est soumis à évaporation, ce qui permet la concentration de l'huile et la récupération du solvant pour son recyclage. L'huile brute obtenue après pression et extraction est alors soumise au raffinage. Ce traitement permet d'éliminer les nombreuses impuretés qui affectent les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'huile (Baudet et Evrard, 1998).

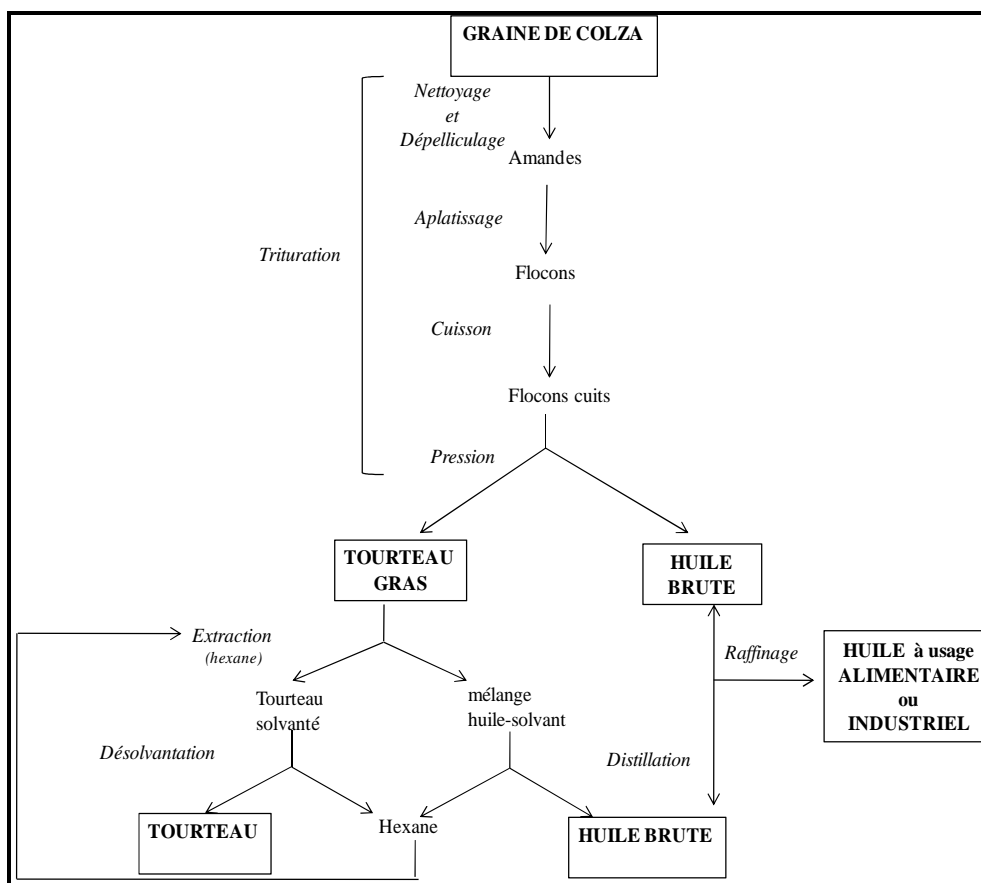


Figure 3. Schéma du procédé de production d'huile et de tourteau de colza.

• L'huile alimentaire

L'industrie alimentaire est le principal débouché de l'huile de colza. C'est une des matières grasses, d'origine végétale, les plus consommées dans le monde, avec les huiles d'olive, de soja, de tournesol et de palme. Elle a une forte valeur énergétique et apporte des éléments nutritifs indispensables non synthétisés par l'organisme humain. Elle est constituée, en majeure partie, d'acide oléique (58 % des acides gras) mais contient aussi des acides gras essentiels, notamment l'acide linoléique (22 %) et l'acide alpha-linolénique (9 %) ; ce dernier, appartenant à la famille des ω -3, il est à la base des propriétés physiologiques de l'huile de colza, telles l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, en diminuant le niveau de « coagulation » du sang, et l'action anti-cholestérolémiante grâce à la capacité d'abaisser le taux de cholestérol. L'huile de colza est aussi connue pour sa faible teneur en acides gras saturés (8 %), valeur la plus faible des huiles végétales. Toutefois, l'utilisation ménagère ne vient qu'en troisième position, après l'huile de tournesol et l'huile d'olive. Il est à noter, qu'au

Canada, la consommation d'huile de colza (variété Canola) représente 70 % de la consommation totale en huiles végétales, du fait de sa haute qualité nutritionnelle (Godon, 1985).

• Le biodiesel

Depuis toujours, les matières grasses d'origine agricole sont utilisées pour la fabrication de produits non alimentaires, notamment les savons, les détergents, les peintures etc. La nécessité de développer des produits éco-compatibles et agro-biosourcés à partir des huiles végétales découle d'exigences liées aux problèmes environnementaux :

- demande croissante en produits biodégradables (protection de l'environnement, lutte contre la pollution),
- diversification des sources d'approvisionnement, en particulier dans la production des biocarburants,
- recherche de nouveaux débouchés pour le maintien des activités agricoles.

C'est pourquoi la lipochimie des huiles végétales, et particulièrement de l'huile de colza est, depuis quelques années, un secteur en plein développement (PROLEA et AMSOL 2001).

L'IFP (Institut Français du Pétrole) a mis au point des procédés permettant de convertir l'huile brute en esters méthyliques à partir du mécanisme de trans-estérification. Les esters présentent un certain nombre d'avantages sur les huiles en raison de leurs propriétés physico-chimiques ; la fluidité et l'aptitude à l'auto-inflammation, qui sont comparables à celles du gazole. De plus, le Diester[®] (nom commercial de l'ester méthylique, issu de la contraction entre « diesel » et « ester ») est biodégradable à plus de 98 % sur 20 jours. Il est, en outre, non toxique et inodore (Dewulf *et al.*, 2005). En Europe, depuis l'année 2009, les plus gros consommateurs d'huile de colza pour la production de bio-carburants, sont l'Allemagne (3,6 millions de tonnes) et la France (3,3 millions de tonnes). Au cours des 30 dernières années, la production a été multipliée par quatre. Cet essor important, tant sur le plan alimentaire qu'industriel, a entraîné une production accrue du co-produit de l'industrie huilière : le tourteau de colza.

1.3. Le tourteau de colza : composition et utilisation

Après extraction de l'huile, la matière grasse résiduelle du tourteau se situe entre 2 et 6 % en fonction des méthodes d'extraction mises en œuvre (Mc Kevith, 2005). Le tourteau de colza est une matière végétale relativement riche en protéines (≈ 40 , voire 45 % sur la base de la matière sèche) avec une composition en acides aminés comparable à celle d'autres céréales (Salunke *et al.*, 1992). En effet, dans le tableau 1, on remarque que les quantités d'acides aminés soufrés (méthionine et cystéine), de thréonine et de lysine sont comparables à celles du tourteau de soja. Par ailleurs, le tourteau de colza est très riche en minéraux, ce qui permet de limiter les apports externes entrant dans toute ration alimentaire. Il est aussi composé par des fibres, sucres solubles et des petites molécules appelées composés anti-nutritionnels (glucosinolates, acide phythique et polyphénols) (Figure 4). Ce produit est donc amplement valorisable dans le domaine de la nutrition animale et représente, ainsi, un réel intérêt économique pour l'industrie porcine et bovine.

Tableau 1. Composition en acides aminés comparée des protéines issues de tourteau de colza et tourteau de soja (g pour 100 g de protéines) (Shahidi, 1990).

Acides aminés	Tourteau de colza	Tourteau de soja
Alanine	4,3	4,3
Arginine	5,8	7,2
Acide aspartique	7	11,7
Cystéine	1,7	1,6
Acide glutamique	2,7	18,7
Glycine	4	4,2
Histidine	7	2,6
Isoleucine	5,8	4,5
Leucine	7	7,8
Lysine	5,8	6,4
Méthionine	1,9	1,3
Phénylalanine	3,8	5
Proline	6	5,1
Sérine	4,6	5,1
Thréonine	4,5	4
Tryptophane	1,3	1,3
Tyrosine	3,1	3,2
Valine	5	4,8

Certains traitements technologiques améliorent la qualité nutritionnelle du tourteau, notamment le chauffage. Ce traitement permet la protection des protéines de la dégradation dans le rumen, ce qui rend le tourteau bien adapté à l'alimentation des ruminants. Malgré les nombreuses propriétés nutritionnelles du tourteau de colza, les tourteaux de soja restent

prédominants. Toutefois, la production communautaire européenne de ce dernier a diminué, passant de 78 % en 1981 à 46 % en 2007, au profit des tourteaux de colza (39 % en 2007 contre 14 % en 1981). Dans l'Union Européenne (25 nations) la consommation totale de tourteaux de colza est de l'ordre de 9 millions de tonnes, soit 12 % de l'ensemble des tourteaux utilisés (2007).

1.4. Les protéines du tourteau de colza

Les protéines majoritaires de la graine de colza sont les cruciférines (globulines 11 S), les napines (albumines 2 S) et les oléosines (protéines des corps lipidiques) (Salleh *et al.*, 2002). Les cruciférines et les albumines sont des protéines de réserve. Elles se trouvent localisées dans la graine au niveau de corps protéiques, connus sous le nom de grains d'aleurone. Elles représentent, respectivement, de l'ordre de 40 % et 28 % de l'azote total de la graine. Les oléosines sont les protéines de structure. Ces trois familles de protéines se différencient par leur structure, leur taille, leur composition en acides aminés. Ces différences leur confèrent des propriétés physico-chimiques spécifiques qui définissent leur rôle physiologique dans la graine (Lemarié *et al.*, 1996). De fait, de par leur composition et leur répartition « parfaitement équilibrée » en acides aminés, les protéines de tourteau de colza peuvent être employées pour l'alimentation animale mais aussi pour la nutrition humaine (Mariscal-Landin *et al.*, 2008). En effet, des études récentes ont montré la haute digestibilité de ces protéines, comparable à celle des protéines du lait (Bos *et al.*, 2007).

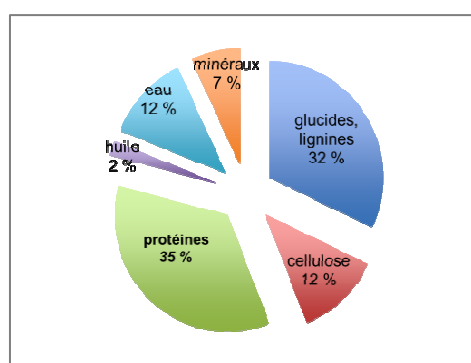


Figure 4. Répartition de la composition des principales classes des composés chimiques du tourteau de colza (% sur la base de la matière sèche).

Tout ceci laisse entrevoir un potentiel élargi du domaine d'utilisation de ce co-produit et aussi d'une valeur ajoutée accrue.

1.4.1. Les cruciférines

Les cruciférines représentent de 40 à 55 % des protéines du tourteau de colza. Elles ont un caractère neutre ($pI = 7,5$) et sont solubles en solutions salines. Elles ont une structure globulaire, très compacte et sont constituées par six sous-unités disposées en anti-prisme trigonal. Leur taille moléculaire est comprise entre 300 et 310 kDa. Les différents monomères des cruciférines sont formés de polypeptides basiques de faible poids moléculaire (chaînes α de 20 kDa) et de polypeptides acides de taille moléculaire plus élevée (chaînes β de 30 kDa) dont l'association est assurée par des interactions ioniques et des ponts disulfure (Schwenke *et al.*, 2000, Dalgarrondo *et al.*, 1986) (Figure 5). Dans le modèle de Plietz et ses collaborateurs (1983), les polypeptides α sont plutôt localisés à la périphérie de la molécule alors que les β font partie du cœur hydrophobe de la protéine. Dans un milieu de faible force ionique, les macromolécules se dissocient réversiblement sous forme monomérique de 150 kDa (7 S). Aux pH acides ou basiques (pH 3 ou pH 9), ou en présence de concentrations élevées d'agents dénaturants (urée ou chlorure de guanidinium), la dissociation se poursuit irréversiblement et libère des sous-unités de 50 kDa (2-3 S). Ces phénomènes d'agrégation et de dissociation, dépendantes du pH, peuvent expliquer les différentes solubilités de ces protéines en fonction de la force ionique (Godon, 1985). Leur température de dénaturation est de 91 °C (Wu et Muir, 2008) Cette haute thermostabilité est probablement due à leur composition en acides aminés, aux interactions inter et intra-protéines.

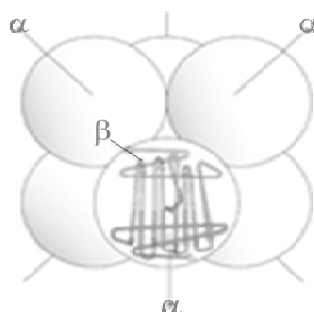


Figure 5. Modèle de la structure quaternaire des protéines 12 S prenant en compte des arrangements hypothétiques des polypeptides α et β au sein de chaque sous-unité (extrait de Godon, 1985).

En ce qui concerne la composition en acides aminés, elle est caractéristique de celle des protéines de réserve. On retrouve en portion majoritaire l'arginine, l'acide aspartique et l'acide glutamique, ce qui confère un taux d'amidation élevé (Schwenke, 1990). Dix isoformes du précurseur des cruciférines de *Brassica napus L.* ont été identifiés. La structure hexamérique résultant de la combinaison de plusieurs isoformes conduit à une haute complexité et une variabilité de la protéine (Dalgallarrondo *et al.*, 1986).

1.4.2. Les oléosines

Les oléosines (Figure 6) sont les protéines de structure prépondérantes dans la graine de colza et représentent de 2 % à 8 % des protéines totales selon la variété végétale. Elles ont une petite taille moléculaire comprise entre 15 et 26 kDa (Huang, 1996) et leur structure est riche en hélices α (Abell *et al.*, 2004). Elles contiennent une partie centrale constituée d'environ 70 acides aminés hydrophobes, le plus long segment hydrophobe connu pour une protéine (Tzen et Huang, 1992). Leur structure particulière implique qu'elles soient intégrées au niveau de la membrane des globules lipidiques dont elles assurent le maintien, en empêchant la coalescence de l'huile lors de la dessiccation de la graine (Parmenter *et al.*, 1995, Leprince *et al.*, 1997). Le point isoélectrique de ces protéines se situe autour de 10.

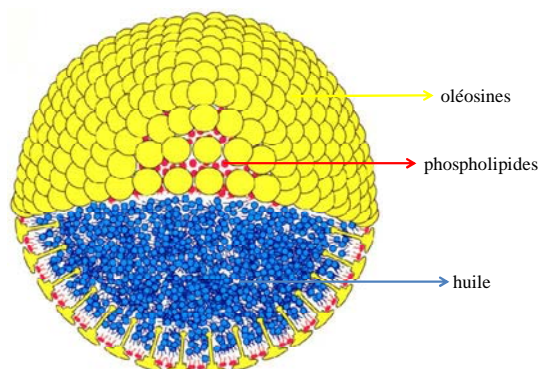


Figure 6. Modèle de corps lipidique (Source internet : <http://www.cepceb.ucr.edu/members/huang.htm> et Huang, 1996).

1.4.3. Les napines

Les napines, objet d'intérêt de cette étude, font partie de la famille des albumines (2 S) et représentent environ 30-40 % des protéines du tourteau. Leur rôle est de constituer une réserve de soufre et d'azote (Higgins *et al.*, 1985). Cette fraction protéique, soluble dans l'eau,

a une taille moléculaire comprise entre 12 kDa et 15 kDa et son point isoélectrique se situe autour de 11 (Monsalve et Rodriguez 1990). Cela résulte du degré d'amidation élevé des acides aspartique et glutamique. Les napines font partie d'une famille multigénique (16 gènes) qui provient d'un précurseur de 21 kDa (Muren *et al.*, 2005). C'est un précurseur inhibiteur trypsique (Mandal *et al.*, 2002) et il est exprimé pendant la phase de maturation de la graine de colza. Son clivage post-traductionnel conduit à la formation de la protéine mature, constituée de deux sous-unités de 34 et 95 acides aminés environ (Figure 7 et Figure 8). Ces deux sous-unités ont un poids moléculaire respectif de 4kDa et 9 kDa environ. Les deux chaînes polypeptidiques sont reliées par des ponts disulfure : deux intra-chaînes et deux inter-chaînes (Barciszewski *et al.* ; 2000). Les liaisons inter-chaînes se situent entre les résidus C10 et C23 de la petite chaîne et sur les résidus C25' et C14' de la longue chaîne. Les ponts disulfure intra-chaînes se situent entre les cystéine C14' et C72' d'un part et C27' et C80' d'autre part de la longue chaîne (Byczynska et Barciszewski, 1999).

Il en résulte une structure tridimensionnelle compacte, riche en hélices α (Larré *et al.*, 2006; Rico *et al.*, 1996). La compacité des napines est due également à la présence de fragments fréquemment répétés dans leur séquence. Une étude réalisée par Gehrig et ses collaborateurs (1996), comparant la structure primaire de la longue et de la courte chaîne des napines, a montré qu'il y a des différences limitée à quelques acides aminés ; ceci traduit un degré d'homologie élevé. Ces répétitions interagissent entre elles en formant un cœur hydrophobe. Ces protéines sont aussi connues pour leur haute résistance à la chaleur puisque leur température de dénaturation est supérieure à 100 °C (Wu et Muir, 2008). A la différence des cruciférines, les napines ont un caractère très hydrophile et la présence de résidus de lysine et d'arginine leur confère des sites d'interactions électrostatiques privilégiés (Jyothi *et al.*, 2007). Néanmoins, le caractère très basique des napines favorise l'interaction avec des ligands non-protéiques, pouvant aussi réduire leurs propriétés biologiques. Leur contenu en cystéine et leur faible poids moléculaire suggèrent une possible relation avec les inhibiteurs de protéases (Guéguen, 1996). Le caractère amphipatique des napines leur confère des propriétés biologiques importantes.

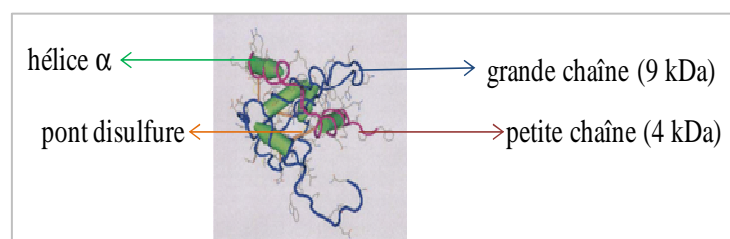


Figure 7. Structure des napines d'après les travaux de Rico *et al.* (1996).

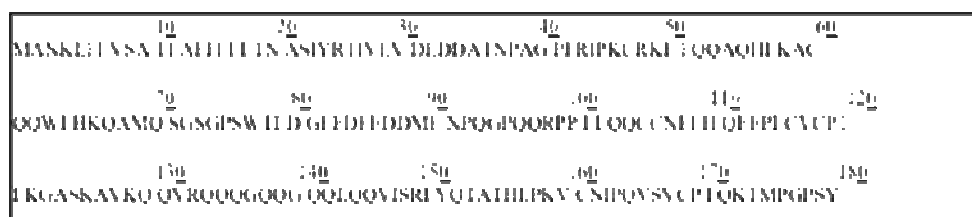


Figure 8. Séquence des napines (Baszczynski et Fallis, 1990). 1-21 : peptide signal. 22-38 : propeptide courte chaîne. 39-74 : courte chaîne. 75-94 : propeptide longue chaîne. 95-180 : longue chaîne.

1.4.4. Propriétés fonctionnelles des protéines de colza

Les isolats de cruciférines et de napines, possèdent différentes propriétés fonctionnelles, liés à leurs caractéristiques moléculaires ; parmi elles, une capacité d'absorption d'eau, des propriétés moussante, émulsifiante et gélifiante ont été mises en évidence. La capacité d'adsorption et de rétention d'eau améliore les qualités organoleptiques des produits carnés (Uruakpa et Arntfield, 2005) ; cette double capacité ainsi que la solubilité des protéines sont corrélées à la capacité de former et stabiliser les émulsions. Une étude assez récente (Wu et Muir 2008) a montré que les émulsions formées avec les cruciférines sont plus stables que celles formées par les napines. Ces propriétés laissent envisager leur utilisation pour la production d'émulsions à usage alimentaire, comme les assaisonnements pour salades ou mayonnaises (Xu et Diosady, 1994a ; Uruakpa et Arntfield, 2005). Les cruciférines et les napines présentent aussi des capacités moussantes supérieures aux protéines de soja. Ces propriétés sont réduites par le traitement thermique, probablement en raison de la dénaturation des protéines. Certains traitements comme l'acétylation sont employés pour améliorer la capacité moussante, mais réduisent significativement leur stabilité (Gruener et Ismond, 1997).

Globalement, toutes les protéines peuvent former un gel, mais se différencient par leur degré de réticulation. La littérature met en évidence que le facteur principal affectant les propriétés gélifiantes des protéines est la taille moléculaire moyenne des polypeptides entrant dans sa composition (Wang et Damodaran, 1991) ; c'est pourquoi les cruciférines forment des gels plus résistants que les napines. Les propriétés gélifiantes sont influencées par le pH, la présence de sels et d'agents dénaturants. La compaction des gels dépend ainsi des interactions électrostatiques et hydrophobes. Par contre, leur stabilité dépend des liaisons hydrogène et des ponts disulfure (Aider et Barbana, 2011).

Depuis 2007, Burcon, société canadienne leader dans le domaine de la valorisation de protéines issues d'oléagineux (soja et canola), en nutrition et santé, a commercialisé deux isolats de globulines et albumines de Canola, appelés respectivement Puratein™ et Supertein™. Par ses propriétés fonctionnelles (formation d'émulsion et de gels) Puratein™ est intégré pour la réalisation de sauces, substituts de viandes, barres protéinées, produit de boulangerie, etc. L'isolat d'albumines Supertein™, quant à lui, présente différentes propriétés fonctionnelles, notamment la haute stabilité, la formation de solution transparente et le pouvoir moussant. C'est pourquoi il est intégré à la production de boissons, confiserie, desserts aérés et barres protéinées.

Ces propriétés fonctionnelles mettent en valeur l'importance des isolats des protéines de colza et de leurs applications dans le domaine de l'alimentation humaine. Toutefois, leur utilisation est limitée par la présence de composés non protéiques dits « anti-nutritionnels ».

1.5. Les composés « antinutritionnels »

Le tourteau de colza est constitué par différents composés responsables de la diminution de ses propriétés nutritionnelles. Ces composés ont un effet toxique et sont responsables de la couleur foncée et du goût indésirable des isolats protéiques. Les principaux composés non protéiques de colza sont les glucosinolates, l'acide phytique et les polyphénols.

1.5.1. Les glucosinolates

Les glucosinolates représentent entre 0,2 % et 2 % de la matière sèche du tourteau de colza (Yang *et al.*, 1988). La structure générale des glucosinolates (Figure 9) est constituée d'un groupement β -D-thioglucose, d'une unité d'oxime sulfonée et d'une chaîne latérale dérivée d'un résidu de méthionine, de phénylalanine ou de tryptophane (Graser *et al.*, 2001).

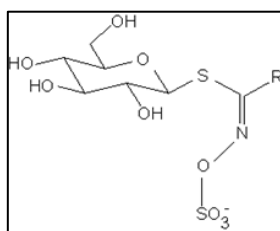


Figure 9. Structure générale des glucosinolates. R : groupement aliphatique, aromatique ou hétérocyclique.

Les glucosinolates sont hydrolysés par desmyrosinases, qui génèrent plusieurs composés toxiques : nitriles, isothiocyanates et oxazolidines. Dans la graine, les glucosinolates et la myrosinase ne sont pas en contact, c'est seulement au moment du broyage et de la trituration que se forment les produits de dégradation. Ces composés provoquent une altération de la palatabilité du tourteau de colza et interfèrent sur le bon fonctionnement de la thyroïde ainsi que sur les processus métaboliques de l'animal (Burel *et al.*, 2000). Grâce au travail des sélectionneurs, des variétés pauvres en glucosinolates (variété dite « 00 ») ont pu être développées. Les effets physiologiques énoncés précédemment sont donc atténués et cette variété de tourteau est mieux acceptée par les animaux.

1.5.2. L'acide phytique

Les phytates (chimiquement connus comme des inositolhexaphosphate) (Figure 10) sont des composés utilisés chez les plantes comme réserve de phosphore. Ils représentent entre 1 % et 7 % de la composition globale du tourteau de colza, sur la base de sa matière sèche (Hudson, 1994). Ils sont considérés comme anti-nutritionnels en raison de leur capacité à interagir avec les résidus basiques des protéines et les cations bi- et trivalents (calcium, magnésium, fer, zinc et molybdène). Cela provoque une diminution de la biodisponibilité de ces minéraux (Liener, 1994). Les complexes formés par interaction phytate-protéine sont peu dégradés par les enzymes de type trypsine, pepsine ou α -amylase. L'acide phytique possède aussi de nombreuses activités bénéfiques, notamment anti-cholestérolémiantes, mais aussi inhibitrices de l'agrégation plaquettaire et antivirale.

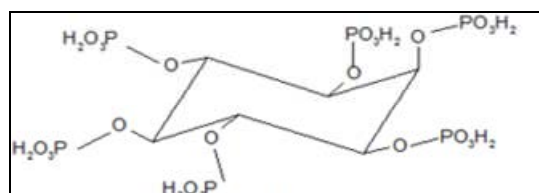


Figure 10. Structure chimique de l'acide phytique.

1.5.3. Les polyphénols

Parmi les tourteaux issus d'oléagineux, celui provenant du colza possède la plus haute quantité de polyphénols (10 - 30 %) soit cinq fois plus que le tourteau de soja (Xu et Diosady, 2002). Les composés phénoliques prépondérants sont les acides phénoliques et les tannins. Parmi les acides phénoliques, les sinapines (Figure 11) sont les principaux constituants phénoliques du colza. Ils peuvent se trouver sous forme libre (15 %) ou estérifiée (85 %). Ils peuvent se complexer avec les protéines, de préférence avec celles de petite taille, par des ponts hydrogène, des interactions hydrophobes ou encore de façon covalente (Xu et Diosady, 2000). Ces composés affectent la qualité du tourteau de colza et de ses protéines, en réduisant leur utilisation dans le domaine alimentaire. Les polyphénols sont responsables de l'altération de la couleur, de la texture ainsi que du goût amer et de l'astringence des aliments (Shahidi et Naczki, 1992). De plus, ces composés ou leurs produits d'oxydation peuvent former des complexes avec les acides aminés essentiels en diminuant leur pouvoir nutritionnel (Xu et Diosady, 2000). Une activité inhibitrice de l'absorption du fer a été mise en évidence. Elle serait due à la formation de complexes phénol-fer tout au long du tractus gastro-intestinal (Brune *et al.*, 2006). Pour ces raisons, de nombreux procédés ont été mis au point pour séparer la fraction polyphénolique de celle des protéines qui présentent toutefois des limitations en termes d'efficacité d'élimination et de coût (Xu et Diosady, 2000). Un compromis est donc nécessaire lors du développement de ce type de procédé pour valoriser les protéines de tourteau de colza dans le domaine alimentaire. Toutefois, certains phénols du colza possèdent une activité antioxydante importante (Wanasundara *et al.*, 1994).

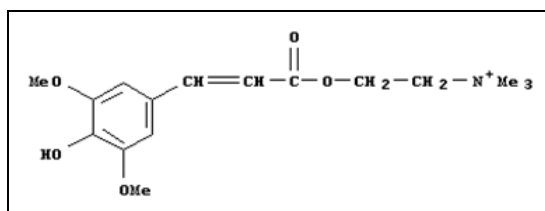


Figure 11. Structure des sinapines.

En résumé

Actuellement, le débouché majeur des graines de colza se trouve dans le secteur alimentaire. Ceci provient notamment de la haute qualité nutritionnelle de l'huile extractible. En outre, depuis une vingtaine d'années, le colza est devenu une ressource énergétique renouvelable, amplifiée avec l'essor de la production de biocarburants.

L'extraction d'huile entraîne la production d'un co-produit, le tourteau de colza, essentiellement utilisé en alimentation animale en vertu de sa richesse en protéines. Parmi ses protéines, les napines présentent un intérêt non négligeable en raison de leurs propriétés antimicrobiennes et de leur abondance. C'est au regard de ces qualités, ainsi que pour leur petite taille, qu'elles ont été choisies comme substrat modèle pour cette étude de protéolyse.

2. EXTRACTION ET PURIFICATION DES PROTEINES DE COLZA

2.1. Production d'un isolat protéique

Comme cela a été indiqué dans les paragraphes précédents, une des voies de valorisation du tourteau de colza consiste à utiliser ses protéines, en alternative aux protéines d'origine animale, dans l'alimentation humaine. Toutefois, la présence des composés anti-nutritionnels empêche son utilisation directe. C'est pourquoi, au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été dédiés à la mise en œuvre des procédés d'extraction et de purification des protéines de tourteau de colza. Les procédés d'extraction permettent d'obtenir des concentrats avec teneur en protéines comprise entre 65 et 90 %, (p/p) ou des isolats de protéines ≥ 90 % (p/p) (Moure *et al.*, 2006). Il est obtenu par solubilisation des protéines dans une solution saline et/ou dans un environnement où le pH est proche du point isoélectrique, ce qui favorise la précipitation des protéines d'intérêt (Rodrigues *et al.*, 2011). La solubilité des protéines dépend des acides aminés qui sont situés à la surface des protéines, du solvant, de la température et du pH. Le point isoélectrique est déterminé par la composition globale en acides aminés. En présence d'une teneur élevée en acides aminés basiques (ex. lysine et arginine) le point isoélectrique est supérieur à 7 ; inversement, il est inférieur à 7 si les acides aminés prépondérants sont acides (ex. acides aspartique et glutamique). L'extraction et l'isolement des protéines impliquent des techniques de solubilisation et de précipitation basées sur la solubilité et le point isoélectrique des protéines.

2.2. L'extraction des protéines par solubilisation

Pendant les dix dernières années, de nombreuses techniques de solubilisation des protéines végétales ont été utilisées. L'extraction peut être réalisée en solution saline ou dans l'eau avec régulation du pH. L'ajout de solutions de soude (NaOH) ou d'acide chlorhydrique (HCl) permet d'obtenir des extraits alcalins ou acides. Cameron et Myers (1983) ont breveté une méthode d'extraction des protéines dans l'eau à partir du tourteau de colza 10-15 % (p/p) durant 60 mn à une température de 35 °C. La soude et le sulfite de sodium (Na₂SO₃) sont les solvants les plus utilisés pour les extractions alcalines. Le rendement obtenu en présence de soude est deux fois plus important que celui obtenu avec le sulfite de sodium ; cependant, l'utilisation de ce dernier permet d'obtenir un isolat brun clair (Vioque *et al.*, 1999a et b ; Gonçalves *et al.*, 2010). En effet, les propriétés réductrices du sulfite empêchent l'oxydation des phénols. Un très bon compromis entre le procédé d'extraction et la minimisation des interactions entre protéines extraites et les composés polyphénoliques a été obtenue, par Pickardt et ses collaborateurs (2009), en utilisant une concentration en NaOH supérieure à 2,8 M un pH compris entre 5,6 et 7,4 à température ambiante et avec une concentration de tourteau/solvant de 5 % (p/v). Pedroche et ses collaborateurs en 2004, ainsi que Ghodsvali *et al.*, en 2005, ont mise en place un procédé d'extraction à pH 9 et une concentration de 12 % (p/v) en tourteau. Ces conditions sont très favorables pour réduire la concentration des phytates, puisque, à pH 12, leur solubilité est minimale (Diosady *et al.*, 1984).

Parmi les travaux réalisés, il a été mis en évidence que la solubilisation des protéines est influencée, en règle générale, par :

- le ratio farine/eau (p/v). Cela peut aussi favoriser le rendement d'extraction, qui, la plupart du temps, augmente avec la concentration du tourteau. Un ratio supérieur à 10 % est parfois limitant à cause de l'augmentation de la viscosité de l'extrait. Cela entraîne une difficulté d'agitation et de centrifugation de la solution ;
- la température qui aide à la solubilisation des protéines (Shen *et al.*, 2008). Cependant, des températures trop élevées peuvent provoquer la dénaturation des protéines ;
- la durée qui, toutefois, ne permet pas d'augmenter le rendement protéique au-delà de 60 mn (Schweizer, 2002) ;

- le pH qui favorise la mise en solution des protéines, surtout s'il est éloigné du point isoélectrique (Rodrigues *et al.*, 2011).

La récupération des protéines de tourteau de colza ainsi solubilisées, est effectuée par précipitation ou par techniques membranaires.

2.3. Techniques de précipitation sélective de protéines

La précipitation de protéines issues de solutions alcalines est en général réalisée par ajustement du pH à la valeur de leur point isoélectrique (Pedroche *et al.*, 2004 ; Ghodsvali *et al.*, 2005 ; Chen et Rohani, 1992). La précipitation isoélectrique peut être favorisée par l'ajout d'agents précipitants, tel l'hexamétaphosphate de sodium ou la cellulose carboxyméthylrique (Tzenget *al.*, 1990). La précipitation au sulfate d'ammonium est une technique couramment employée. L'utilisation de ces sels à une concentration spécifique qui est fonction des protéines, diminue leur solubilisation et favorise leur précipitation. Lorsque la concentration en sel est augmentée, une partie des molécules d'eau est attirée par les ions salins, ce qui diminue le nombre de molécules d'eau disponibles pour interagir avec la partie chargée de la protéine. Les interactions protéine-protéine deviennent alors plus fortes que les interactions solvant-soluté. Par conséquent, les protéines s'associent et précipitent grâce aux interactions hydrophobes ; ce processus est connu sous le nom de « salting-out ».

Les globulines sont solubles dans les solutions salines et leur point isoélectrique (pI) est de 7. En général, leur extraction se réalise en milieu alcalin et en présence de sels. Les albumines sont solubles dans l'eau et leur pI se situe autour de 11. Actuellement, leur extraction se fait en solution basique (pH entre 7 et 11) et éventuellement en présence de NaCl pour augmenter la force ionique. Ces méthodes de récupération ne permettent pas une purification complète des protéines et leur rendement est faible. Ce dernier peut être amélioré par l'utilisation de séparateurs membranaires, notamment l'ultrafiltration (Xu et Diosady, 1994a).

2.4. La séparation membranaire

Depuis plus d'une vingtaine d'années, la technologie membranaire est devenue une véritable technologie de séparation. L'atout principal de la séparation membranaire est

économique et vient du fait qu'elle fonctionne sans l'emploi de produits chimiques et sans changement de phase. D'autres avantages, liés aux conditions de fonctionnement « douces », se situent au niveau des contraintes de cisaillement, de la température et de l'absence de changement d'état.

Le procédé de séparation membranaire est basé sur la présence d'une membrane sélective, qui, sous l'effet d'une force de transfert, permet la sélection ou interdit le passage de certains composés entre deux milieux qu'elle sépare. Il existe plusieurs méthodes ou principes pour permettre aux substances de traverser les membranes :

- l'application de pressions relativement élevées : filtration,
- le maintien d'un gradient de concentration : dialyse,
- l'introduction d'un potentiel de membrane : électro-osmose.

Il existe quatre types de procédés membranaires à gradient de pression : la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (OI). Ces procédés se distinguent par la taille (seuil de coupure), les caractéristiques physico-chimiques des molécules qu'ils peuvent séparer et la pression de fonctionnement. Le seuil de coupure est défini comme étant la masse molaire critique pour laquelle 90 % des solutés sont retenus par la membrane.

La microfiltration, MF, et l'UF sont utilisées pour éliminer des molécules de taille relativement importantes : respectivement 100-500 kDa et 5-100 kDa et les différences de pression trans-membranaires (PTM) sont inférieures à 5 bar. Les sels et l'eau sont éliminés par nanofiltration, NF, (0,2-5 kDa, 4 bar) et osmose inverse, OI, (Figure 12). Les critères de sélection d'un procédé dépendent des caractéristiques des substances à séparer et de celles des membranes (dimension spatiale, nature chimique, charge électrique).

La MF concerne, en règle générale, les molécules en suspension : séparations particulières. Dans la pratique, on rencontre ce type d'opération lorsqu'on a la nécessité de clarifier un milieu. Une autre application importante est la rétention des microorganismes telles les bactéries ou les levures.

L'UF concerne la rétention des macromolécules (protéines, polysaccharides, etc.) et d'autres espèces de taille équivalente, notamment les virus et les particules colloïdales. Ce type de membranes est utilisé pour réaliser des séparations « macro/micro-moléculaires ». La raison à cela est que les pores de ces membranes étant plus petits que celles d'une membrane de MF, on peut éviter un colmatage interne difficile à nettoyer. Une spécificité de l'UF est la

diafiltration. Lors de cette opération une nouvelle quantité de tampon est ajoutée afin d'éliminer les molécules résiduelles du rétentat (impuretés, sels, petites molécules, etc.) en augmentant la pureté du produit à purifier.

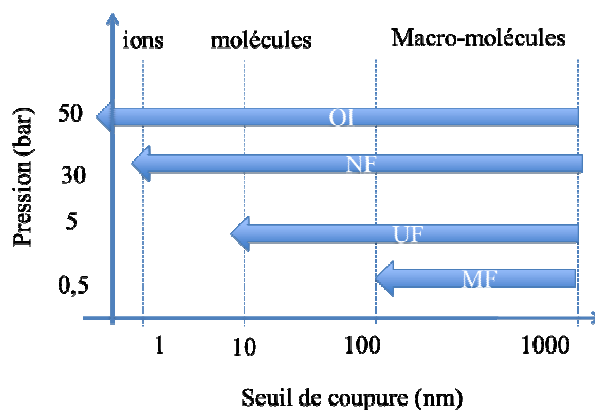


Figure 12. Domaines de séparation des techniques membranaires à gradient de pression.

2.5. Récupération des protéines par techniques membranaires

Les procédés membranaires sont utilisés pour la récupération des protéines végétales après leur extraction (Ghodsvali *et al.*, 2005). L'ultrafiltration et la diafiltration séparent et concentrent les molécules en solution. Ceci permet d'obtenir une meilleure qualité des isolats en limitant le contenu en composés anti-nutritionnels. L'ajout de solutions salines est aussi indispensable pour la diminution des interactions entre protéines et phytates ou glucosinolates (Kroll *et al.*, 1991). Xu et Diosady, en 2002, ont montré qu'à la fin du procédé, 80 % des polyphénols étaient éliminés par l'ajout de chlorure de sodium (NaCl à 0,05 M) et de dodecyl sulfate de sodium (SDS 1 %). De plus, les isolats issus d'UF conservent de meilleures propriétés fonctionnelles par rapport à ceux obtenus par précipitation. Le procédé d'UF est préférentiellement utilisé pour la purification des isolats de napines et de cruciférines à grande échelle (Bérot *et al.*, 2001 ; Bérot *et al.*, 2005). En effet, il permet de limiter le coût de l'opération par rapport aux quantités de sels utilisées dans la méthode dite de « salting-out ».

2.6. Méthodes de séparation chromatographique

Après séparation membranaire, on obtient des mélanges de protéines. La séparation entre les différentes protéines du mélange peut être réalisée par une ou la combinaison des techniques suivantes :

- techniques chromatographiques : d'exclusion stérique (Dalgarrondo *et al.*, 1986), d'échange d'ions (Vioque *et al.*, 1999b) et en phase inversée (Bérot *et al.*, 2005) ;
- dialyse (Salleh *et al.*, 2002).

Dans la littérature, les techniques chromatographiques sont les plus employées pour la purification des protéines de colza, puisque, en cas de dialyse, les albumines ont tendance à co-précipiter avec les globulines suite à la formation de complexes protéines/acides phytiques.

La plupart des méthodes ont été développées pour purifier les protéines à l'échelle du laboratoire. Les procédures à grande échelle sont la précipitation sélective des protéines par le sulfate d'ammonium (Simard *et al.*, 1977) et, plus récemment, la combinaison des techniques membranaires et chromatographiques (Bérot *et al.*, 2005). Ces derniers auteurs proposent un procédé de purification des protéines de colza par nanofiltration, chromatographie d'exclusion stérique et d'échange d'ions. La combinaison de ces techniques se montre très satisfaisante pour la production à l'échelle pilote. Un procédé de purification par UF et diafiltration a été également proposé pour les protéines de Canola (Xu et Diosady, 1994b ; Ghodsvali *et al.*, 2005). Ces études ont montré que les isolats obtenus sont pauvres en acide phytique, glucosinolates et que leurs propriétés biologiques sont bien préservées et meilleures que celles des protéines purifiées par précipitation isoélectrique.

En résumé

La valorisation du tourteau par utilisation de ses protéines dans l'alimentation humaine nécessite leur extraction et leur purification. L'extraction par solubilisation est la technique la plus employée. Toutefois, l'utilisation d'une seule technique de séparation ne permet pas une séparation optimale des molécules d'intérêt. C'est la raison pour laquelle la séparation membranaire et la chromatographie liquide sont souvent combinées. La chromatographie liquide est certainement la technique la plus utilisée. Cependant, l'exigence de produire des molécules bioactives (dans des fractions peptidiques) à grande échelle, adaptées aux contraintes des industries pharmaceutique et alimentaire, laisse la place au développement de la séparation par filtration membranaire.

Le développement d'un procédé d'extraction sélectif permettant de faciliter le procédé de purification des napines, à petite et à grande échelle, représente ainsi un enjeu intéressant.

3. ANALYSE STRUCTURALE DES PROTEINES

Les techniques d'extraction et de purification peuvent avoir un impact sur la qualité des protéines au niveau moléculaire et, par conséquent, réduire leur pouvoir biologique. Les prochains paragraphes sont dédiés à la description des techniques employées pour l'étude de la structure et de la stabilité des protéines.

3.1. Les différents niveaux de structuration des protéines

On identifie, chez les protéines, quatre niveaux structuraux : primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire. Le premier niveau correspond à la succession linéaire des acides aminés liés l'un à l'autre par une liaison dite « peptidique ». La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale. Il en existe trois grandes catégories selon l'échafaudage des liaisons hydrogène, et ainsi, selon le repliement des liaisons peptidiques : il s'agit des hélices α et feuillet β ainsi que des coudes. La structure tertiaire est définie comme le repliement tridimensionnel de la protéine et dépend de la structure primaire. Normalement, les zones hydrophobes sont localisées au cœur de la protéine, tandis que les résidus hydrophiles sont en contact avec la phase aqueuse. La structure tridimensionnelle des protéines est intimement liée à sa fonction. Lorsque cette structure est détruite, voire

simplement modifiée, la protéine est dénaturée et son activité disparaît. L'association d'au moins deux chaînes peptidiques, par des liaisons covalentes, des ponts hydrogène et/ou par des interactions hydrophobes et électrostatiques, constitue la structure quaternaire. Ce complexe peut être constitué de sous-unités équivalentes ou distinctes et former des dimères, trimères, tétramères etc. Parmi les protéines végétales, on distingue deux catégories : les homoprotéines, formées seulement par des acides aminés (albumines) et les hétéroprotéines, protéines fixées à des composés non protéiques appelés groupes prosthétiques (ovalbumine, caséine, lipoprotéines) (Damodaran, 2005).

De nombreuses protéines (du lait, de poisson, de volaille, d'œuf, de céréales, de légumineuses et d'oléagineux) trouvent une application dans l'industrie alimentaire, des nutraceutiques et de la cosmétique. L'origine et la nature variées de ces protéines conduisent à des applications nombreuses mais liées à la composition, à la structure et aux propriétés de ces molécules. C'est pourquoi il y a un besoin de plus en plus important de maîtriser la conformation de ces protéines, de connaître les facteurs capables d'interférer sur leur structure et, par conséquent, sur leurs fonctionnalités. Il existe plusieurs techniques d'analyse structurale basées sur la capacité d'adsorption des acides aminés qui constituent les protéines. Les signaux obtenus sont spécifiques du repliement secondaire ou tertiaire.

3.2. Le dichroïsme circulaire (DC)

Depuis quelques années le dichroïsme circulaire (DC) est devenu une technique très reconnue pour la mesure des modifications structurales des protéines. Cette méthode repose sur la capacité des chromophores chiraux (optiquement actifs), d'adsorber différemment la lumière circulairement polarisée à gauche et à droite. La différence entre ces deux absorbances (Eq. E 1) donne un spectre dichroïque :

$$\Delta A = A_g - A_d \quad (\text{E 1})$$

où A_g et A_d sont respectivement l'absorbance de la lumière polarisée à gauche et à droite. Un spectre peut souvent être exprimé en termes d'ellipticité (degrés) (eq. E 2) :

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) \quad (\text{E 2})$$

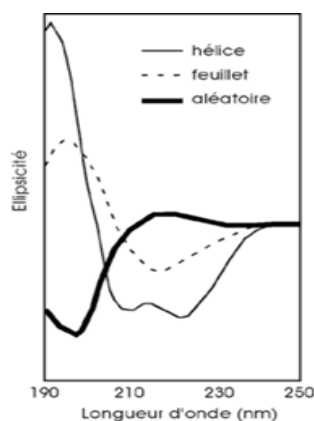
où a et b sont respectivement les axes majeur et mineur de l'ellipse résultante. Il existe une relation entre ΔA et l'ellipticité, connue comme $\theta = 32,98 \Delta A$. En DC, l'unité de répétition du polymère qui donne le signal, est la liaison peptidique. La moyenne du poids des résidus (MRW) pour ces liaisons est calculée en multipliant le poids moléculaire d'un polypeptide (M , en Da) par le nombre d'acides aminés (N) de la chaîne (soit $N-1$).

L'ellipticité moyenne résiduelle (θ_{MRW}) à une longueur d'onde λ est ainsi obtenue (Eq. E 3):

$$[\theta]_{MRW,\lambda} = MRW \times \theta_{\lambda} / 10 \times d \times c \quad (\text{E 3})$$

où θ_{λ} est l'ellipticité observée (degrés) à la longueur d'onde λ , d est le trajet optique de la cuve (cm) et c , la concentration de la protéine en g.mL^{-1} .

Les chromophores des protéines sont les acides aminés aromatiques (qui absorbent entre 260 et 320 nm), les liaisons peptidiques (240 nm) et les ponts disulfure (260 nm). Leur absorption de la lumière donne lieu à des spectres spécifiques. Ainsi, à partir des caractéristiques de ces spectres, il est possible d'avoir des informations sur les structures secondaire et tertiaire de la protéine. Le DC est aussi utilisé pour l'étude de la stabilité structurale d'une protéine suite au traitement thermique ou avec un agent dénaturant (urée ou chlorure de guanidinium) (Kelly et Price, 2000). Les avantages de cette technique sont la simplicité, la rapidité et les faibles quantités d'échantillon nécessaires pour chaque analyse. La méthode est aussi non intrusive, ce qui permet l'utilisation du même échantillon pour



d'autres études.

Figure 13. Spectres DC (UV lointain) spécifiques correspondent aux trois types de structure secondaire des protéines d'après Horton *et al.*, (2000).

Les mesures effectuées dans l'UV lointain (190-260 nm), donnent des informations sur la structure secondaire de la protéine, puisqu'il s'agit de la zone d'adsorption de la liaison peptidique. Le spectre DC obtenu est spécifique pour les différents types de structure secondaire (hélice, feuillet et aléatoire) (Figure 13) (Horton *et al.*, 2000). Le spectre des protéines riches en hélices α est caractérisé par deux pics, respectivement à 208 et 222 nm. L'absence du signal à 222 nm est spécifique de la structure en feuillet (Kelly et Price, 2000). Il existe plusieurs logiciels aptes à estimer la composition (en pourcentage) en hélices α et en feuillet β qui constituent la protéine.

Les spectres dans le proche UV (260-320 nm) sont obtenus à partir du signal des acides aminés aromatiques qui absorbent à une longueur d'onde spécifique. Le pic d'absorbance du tryptophane se situe autour de 290 nm, celui de la tyrosine entre 275 et 282 nm et enfin celui de la phénylalanine entre 255 et 270 nm. La forme et l'intensité d'un spectre proche UV dépendent du nombre d'acides aminés aromatiques de la protéine, de leur mobilité, de leur environnement (liaisons hydrogène, groupes polaires) et de leur disposition dans l'espace (Kelly *et al.*, 2005). L'étude par DC dans le proche UV est souvent utilisée pour définir la structure tertiaire des protéines. Cependant, le signal est parfois trop faible pour donner des informations significatives. C'est pourquoi cette technique est associée à la fluorescence.

3.3. La fluorescence

La fluorescence est une émission lumineuse générée suite à l'excitation d'une molécule (fluorophore) par absorption d'un photon. Elle est suivie par l'émission spontanée de la même lumière. En effet, pendant un très court moment, la molécule qui adsorbe le photon, se trouve dans un état excité (singulet). Le retour à un état énergétique plus bas (état fondamental), va caractériser la fluorescence (Parker, 1968).

La fluorescence des protéines est liée à l'absorbance des acides aminés aromatiques : tryptophane, phénylalanine et tyrosine. Cependant, chez les protéines contenant les trois acides aminés, la fluorescence émise est souvent dominée par la seule contribution du tryptophane qui a une absorbance et un rendement d'émission plus importants que les deux autres résidus aromatiques. En effet, la sensibilité du tryptophane est beaucoup plus élevée que celle de la tyrosine et de phénylalanine (Parker, 1968).

Le changement structural d'une protéine, comme la dénaturation, induit souvent des modifications d'émission de fluorescence du tryptophane ou de la tyrosine pour les protéines sans tryptophane. L'émission du tryptophane d'une protéine peut varier selon l'environnement où il est exposé. C'est pourquoi son intensité de fluorescence augmente et diminue au cours de la dénaturation de la protéine. Le déplacement de l'émission maximale (λ_{max}) du tryptophane est appelé « shift ». Si le tryptophane se trouve dans un environnement hydrophobe (le cœur de la protéine), on assiste à un déplacement de sa λ_{max} vers le bleu, appelé « bleu shift ». Inversement, dans le cas d'une dénaturation de la protéine le tryptophane est exposé au solvant et son émission de fluorescence se déplace vers le rouge : « red shift ». La fluorescence est une technique largement utilisée pour l'étude de la structure tertiaire des protéines et en particulier pour l'analyse de leur processus de dénaturation. Parmi les agents dénaturants utilisés, les plus communs sont la température, le chlorure de guanidinium (Gdm,HCl) et l'urée. En règle générale, l'augmentation de la température provoque une diminution de l'intensité de fluorescence. Une augmentation de la concentration en agent dénaturant affecte aussi significativement la fluorescence du tryptophane et de la tyrosine. Cela est souvent utilisé pour évaluer le taux de déstructuration des protéines et leur stabilité.

3.4. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage initiée par Privalov (1979), est une technique qui a été très développée au cours des dernières années, pour l'étude de la stabilité thermique des protéines (Privalov, 1979). La stabilité d'une protéine peut être définie comme étant sa capacité à conserver la structure tridimensionnelle d'une chaîne polypeptidique dans des conditions extrêmes (température, pH, agents chimiques, etc.).

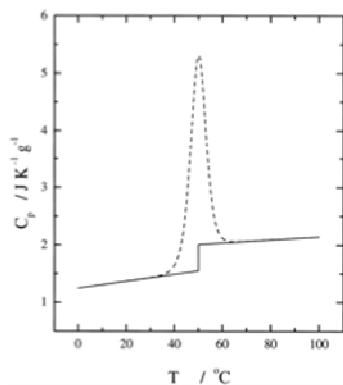
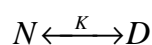


Figure 14. Thermogrammes typiques obtenus suite à la dénaturation thermique d'une protéine globulaire en solution aqueuse. La ligne continue représente la capacité calorifique en excès du lysozyme à l'état natif et dénaturé. La ligne en pointillés montre l'énergie absorbée associée à la réaction de dénaturation (Cooper, 2000).

La DSC fait partie des techniques permettant de déterminer la résistance de la structure des protéines à la température, tout en mettant en évidence leur processus de déstructuration. L'analyse de la variation de la chaleur spécifique (C_p) fournit des informations sur l'état natif de la protéine et sur les états intermédiaires qui apparaissent au cours du processus de dénaturation par la température (Figure 14). Dans le cas le plus simple, la dénaturation d'une protéine est réversible. Elle n'existe que sous deux formes (native et dénaturée) qui sont à l'équilibre. Ce modèle à deux étapes, proposé par van't Hoff est appelé « modèle à deux états » (two-state model) :



où N est la protéine sous sa forme native, D est l'état dénaturé et K, la constante d'équilibre entre les deux états. La constante d'équilibre, K, est définie par la relation (Eq. E 4) :

$$K = \left[\frac{D}{N} \right] = \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (\text{E 4})$$

où α représente le degré de transformation (Privalov, 1979). Malheureusement, ce modèle présente de nombreuses restrictions, car les protéines n'ont pas toujours un comportement simple représenté par deux états. La validité de la méthode van't Hoff peut être évaluée par la DSC qui donne la valeur réelle de l'enthalpie du processus de dénaturation. En effet, une des particularités de la DSC est la possibilité de déterminer la variation d'enthalpie (ΔH) calorimétrique du processus et de celle de van't Hoff à partir d'un seul thermogramme. L'enthalpie calorimétrique (ΔH_{cal}) représente la surface sous la courbe du pic d'absorption de chaleur (Q_T) divisée par le nombre de moles de protéine impliquées (η) (Eq. E 5) :

$$\Delta H_{\text{cal}} = \frac{Q_T}{\eta} = \int_{T_i}^{T_f} \Delta C_p (T) dT \quad (\text{E 5})$$

La variation d'enthalpie de van't Hoff (ΔH_{vH}) s'obtient à partir du tracé calorimétrique selon la relation suivante (Eq. E 6) (Privalov, 1979):

$$\Delta H_{\text{vH}} = \frac{4RT_m^2 \Delta C_{p\text{max}}}{Q_T} \quad (\text{E 6})$$

où ΔH_{vH} (Kj.mol^{-1}) est l'enthalpie de van't Hoff, R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T_m la température de transition (Kelvin) et ΔC_{pmax} (Kj.K^{-1}) la variation de la capacité calorifique à T_m .

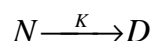
Lors d'un processus en une seule étape, la variation d'enthalpie de van 't Hoff est égale à la variation d'enthalpie réelle ($\Delta H_{vH} = \Delta H_{cal}$). En revanche :

- si $\Delta H_{vH} < \Delta H_{cal}$, la dénaturation provoque l'apparition d'états intermédiaires instables ;
- si $\Delta H_{vH} > \Delta H_{ca}$, des interactions intermoléculaires se créent.

Une autre quantité souvent utilisée en calorimétrie différentielle est le rapport $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$, qui correspond au nombre de moles des molécules coopératives rapporté au nombre de moles des protéines totales étudiées. Si son rapport est :

- proche de 1, la transition se fait en une seule étape (cas pour des protéines globulaires de petite taille) ;
- supérieur à 1, ceci indique que la structure native comporte plusieurs domaines coopératifs (cas des molécules de plus haute masse molaire) ;
- inférieur à 1, cela implique que le processus est irréversible, ce qui conduit à une distorsion du pic ; ou alors, la masse molaire d'une unité coopérative n'a pas été correctement estimée.

Le cas d'une dénaturation irréversible peut se schématiser comme suit :



Cette irréversibilité de réaction peut être déterminée expérimentalement. Si un échantillon est chauffé une seconde fois et qu'aucune absorbance de chaleur n'est observée, alors la dénaturation est irréversible. Dans ce cas, si l'on connaît K (constante d'ordre 1), le modèle peut s'écrire comme une variation de ΔC_p en fonction de la température. L'équation d'Arrhenius (Eq. E 7) décrit cette dépendance :

$$K_{app(t)} = A \exp\left(\frac{-EA}{RT}\right) \quad (\text{E 7})$$

où $K_{app(t)}$ est la constante de vitesse (s^{-1}), A est le facteur de collisions (s^{-1}), E_a est l'énergie d'activation de la réaction ($J.mole^{-1}$), R la constante des gaz parfaits ($J.K^{-1}.mole^{-1}$) et T la température (K). Le modèle cinétique le plus communément appliqué au procédé de dénaturation des protéines (Eq. E 8) s'écrit ainsi :

$$C_p^{exc} = e C_p^{max} \exp\left(\frac{E_a}{RT_m^2}(T - T_m)\right) \times \exp\left[-\exp\left(\frac{E_a}{RT_m^2}(T - T_m)\right)\right] \quad (\mathbf{E\ 8})$$

où C_p^{exc} est la chaleur spécifique en excès (correspond à la formation irréversible de l'état dénaturé) et C_p^{max} est la chaleur spécifique à la température de dénaturation (Conejero *et al.*, 1991 ; Lepock *et al.*, 1990).

Ces modèles tendent à décrire le comportement des protéines suite à l'augmentation de la température. Il faut souligner que le procédé de dénaturation est souvent très complexe, surtout pour les protéines constituées de plusieurs sous-unités. On peut retrouver de nombreux états intermédiaires lors de la dénaturation indépendante ou simultanée des différentes parties de la protéine. Ainsi, pour simplifier la description du processus de déstructuration, les pics obtenus peuvent être décomposés en unités élémentaires (Freire et Biltonen, 1978 ; Privalov, 1985). La dénaturation conduit à la rupture d'un nombre élevé de liaisons faibles. Les états intermédiaires vont donc différer d'un point de vue énergétique. A partir de l'énergie de ces états, il est possible de déterminer la nature et l'importance des interactions intervenant dans la structure native des protéines.

3.5. Facteurs impliqués dans la dénaturation des protéines

Les principaux facteurs qui peuvent affecter la structure d'une protéine sont la chaleur, le pH, les radiations, les forces mécaniques (agitation), les agents dénaturants qui détruisent les liaisons hydrogène, ou d'autres reducteurs qui détruisent les ponts disulfure (bêta-mercapto-éthanol et dithiothréitol (DTT)). La chaleur a comme effet de briser les liaisons faibles (hydrogène) reliant les radicaux de la chaîne et de rompre les interactions hydrophobes non polaires. La dénaturation thermique est souvent appliquée dans le procédé d'hydrolyse pour favoriser l'accessibilité de l'enzyme sur le substrat (Mahmoud, 1994 ; Cui *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009).

La plupart des protéines sont dénaturées à des pH extrêmes, en milieu acide (Zaroog et Tayab 2012) ou alcalin (Pande *et al.*, 2009). L'hypothèse de base est que la charge nette de la protéine conduit à des répulsions électrostatiques intramoléculaires, suffisamment fortes pour vaincre les forces attractives, qui, par conséquent, induisent une dénaturation de la protéine. En règle générale, les protéines sont plus stables au voisinage de leur point isoélectrique (pI). Les agents dénaturants fragilisent les interactions hydrophobes des protéines ou ses ponts disulfure. Ils sont souvent utilisés pour l'étude du procédé de dénaturation et la maîtrise des principes physico-chimiques qui gouvernent ce phénomène.

En résumé

La fonction biologique d'une protéine est très nettement liée à sa structure. Ainsi, la connaissance des facteurs affectant la stabilité structurale d'une molécule se révèle très importante pour la mise en œuvre des procédés permettant leur récupération (extraction/purification) et le processus de leur transformation (protéolyse enzymatique).

Lors de cette étude, les techniques de DSC, CD et fluorescence pourront être employées pour étudier et maîtriser les processus de dénaturation chimique et thermique de napines. La maîtrise de l'état structural de la protéine sera à la base du contrôle du procédé de protéolyse (cinétiques et propriétés des peptides libérés).

4. DES PROTEINES AUX PEPTIDES : LE PROCEDE DE PROTEOLYSE ENZYMATIQUE

Comme nous avons pu le voir au début de ce manuscrit, les protéines issues d'agro-ressources ont une potentialité intéressante dans divers secteurs industriels, puisqu'elles peuvent être utilisées comme sources de peptides bioactifs (Smacchi et Gobetti, 2000). En effet, les propriétés biologiques et fonctionnelles des protéines peuvent être influencées par les technologies mises en œuvre. La protéolyse enzymatique fait partie de ces procédés de par sa capacité à libérer des peptides ayant, ou non, une activité biologique et pouvant avoir une application dans les domaines génériques des nutraceutiques, pharmaceutique, cosmétologique, etc. (Yoshinori *et al.*, 2010). En effet, étant potentiellement présents, mais inactifs au sein de la chaîne d'acides aminés qui constitue les protéines, ces peptides doivent tout d'abord en être intégralement extraits pour pouvoir exprimer leur action physiologique.

4.1. Les protéases : définition et classification

La protéolyse enzymatique est réalisée par l'action d'enzymes spécifiques communément appelées protéases. Les protéases sont des catalyseurs biologiques présentant une spécificité réactionnelle qui est due à la fois à la conformation et la composition en acides aminés de leur site catalytique et à la complémentarité structurale entre enzyme et substrat. Aujourd'hui, dans le commerce, il existe un large choix de protéases d'origine végétale (broméline, papaïne, ficine, etc.), animale (trypsine, pepsine) microbienne (Alcalase[®], Neutrase[®]...), fongique et virale (Flaviastase ou transcriptase inverse). Actuellement, les protéases d'origine bactérienne sont les plus employées, notamment à partir de *Bacillus* et *Streptomyces*. Ces protéases correspondent à des mélanges enzymatiques et possèdent une large gamme de spécificités.

La capacité des protéases à hydrolyser un substrat protéique est très variable et dépend du (ou des) site(s) de clivage sur le(s) quel(s) elles peuvent agir. Les protéases qui clivent entre des acides aminés précis sont dites « spécifiques », tandis que celles qui clivent plusieurs sites de clivage sont « aspécifiques ». Ces enzymes sont classées par rapport à leur capacité à hydrolyser les liaisons peptidiques situées à l'intérieur (endoprotéases) ou aux extrémités N- ou C- terminales des protéines (exoprotéases) (Aluko *et al.*, 2005). Les endopeptidases génèrent des peptides de taille relativement grande, tandis que les exoprotéases conduisent à la libération d'acides aminés et de petits peptides (di-, tri, tétra-peptides).

La classification des enzymes est réalisée par un système de numération standard EC (Enzyme Commission number). Elle est basée sur la réaction chimique catalysée par les enzymes. Le sigle EC est suivi par quatre chiffres représentant le classement de l'enzyme. Les protéases sont identifiées avec le sigle EC 3. Les chiffres suivants définissent une activité spécifique. Par exemple, EC 3. 4. 24 est le classement des métalloprotéases.

Selon la spécificité d'action, on distingue les protéases à sérine, aspartyl-protéases, les cystéine-protéases et les métalloprotéases. Les protéases à sérine sont des endopeptidases caractérisées par la présence d'une sérine dans leur site actif. Elles sont classées en chymotrypsines et subtilisines (trypsine, chymotrypsine, élastase et pancréatine) par rapport à leur structure primaire. Ces protéases sont généralement actives à pH neutre ou alcalin et sont très spécifiques. La trypsine catalyse le clivage de la liaison peptidique au niveau de la lysine et de l'arginine. La chymotrypsine hydrolyse la chaîne peptidique au niveau de la

phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'histidine, la leucine et la méthionine. L'élastase est spécifique des acides aminés hydrophobes, telle l'alanine.

Les aspartyl-protéases doivent leur nom à la présence de deux résidus d'aspartate. Elles sont actives à des pH acides, et le représentant le plus connu est la pepsine. Elles sont spécifiques des acides aminés aromatiques et ont une préférence pour les résidus hydrophobes.

Les thiol ou cystéine-protéases intègrent dans leur site actif un résidu de cystéine. Ne font partie des enzymes d'origine végétale (papaïne et ficine) et bactérienne (clostripaïne). Elles possèdent une haute spécificité.

Les métalloprotéases (Thermolysine, Neutrase) sont caractérisées par la présence d'un ion de Zn^{2+} dans leur site catalytique. Parmi les métalloprotéases, la carboxy-peptidase A (enzyme pancréatique bovine) est la protéase la plus étudiée. Elle est spécifique des acides aminés aromatiques.

Les protéases, en tant que molécules protéiques, ne peuvent accomplir leur action que si leur structure est préservée. Pour cela, certaines conditions physico-chimiques doivent être respectées pour que les protéases soient actives. Il est bien connu que chaque enzyme a un optimum d'activité dans certaines conditions de pH et température.

4.2. Mécanisme d'actions des enzymes

La réaction d'hydrolyse par les protéases peut s'effectuer selon deux types de mécanisme :

- « one-by-one », protéine par protéine, ce qui conduit à l'obtention de polypeptides intermédiaires et ensuite à des peptides de petite taille ;
- « zipper », protéolyse simultanée sur l'ensemble des protéines du mélange, ce qui engendre la formation des peptides de tailles variées.

Le mécanisme d'hydrolyse affecte qualitativement les mélanges obtenus et par conséquent leurs fonctionnalités. Aujourd'hui le phénomène de protéolyse est très étudié afin de pouvoir prédire les conditions expérimentales nécessaires pour obtenir un hydrolysats à propriétés spécifiques. Le choix de l'enzyme et du DH à atteindre sont actuellement les paramètres pris en considération pour l'obtention de ces peptides (Chabanon *et al.*, 2007, Lacroix *et al.*, 1983).

4.3. Les paramètres affectant l'activité enzymatique

Chaque enzyme possède un optimum d'activité qui est fonction de la température, du pH, du rapport enzyme/substrat (E/S) et de la nature du substrat.

- La température

La température entraîne, en général, une augmentation de la vitesse des réactions biocatalysées. Toutefois, au-delà d'une certaine valeur seuil, propre à chaque couple protéine/catalyseur, la chaleur peut provoquer une altération de leur structure tertiaire qui conduit à la destruction de son site actif. On définit alors, la température optimale qui, pour une large majorité d'enzymes connues, se situe entre 25 °C et 60 °C. Cependant, les protéases ont la capacité de catalyser des réactions jusqu'à de températures de 75 °C. La température a aussi un effet sur la protéine substrat, qui en altérant sa structure, peut favoriser la rupture de ses liaisons peptidiques. L'accessibilité de l'enzyme au site de coupure est ainsi favorisée. C'est pourquoi, souvent, les substrats subissent un prétraitement thermique (Hamada, 1992 ; Whang *et al.*, 2009). Il s'avère aussi que les conditions de protéolyse induisent la formation d'agrégats de protéines. Cette modification structurale réduit l'accessibilité de l'enzyme aux sites de clivage (Whang *et al.*, 2009).

- Le pH

Les variations de pH peuvent provoquer des changements d'ionisation des groupements impliqués dans la réaction de catalyse ou dans la fixation du substrat. Par conséquent, il est observé une altération de l'affinité de l'enzyme par le substrat et/ou la modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme ou du substrat. Ainsi, le pH optimal dépend à la fois de la nature de l'enzyme et de l'état du substrat.

- Le rapport Enzyme/Substrat (E/S)

De manière générale, le rapport E/S peut varier de 1/1000^{ème} à 1/ 20^{ème} en fonction de la source protéique et de l'activité enzymatique (Godon, 1985). La concentration initiale d'enzyme est importante puisqu'elle permet de déterminer, de manière proportionnelle, la vitesse initiale de la réaction. Pour ce qui concerne la concentration en substrat, elle peut être très variable. En général, elle est inférieure à 20 g/L pour les réactions classiques à l'échelle du laboratoire et entre 20 et 200 g/L pour les hydrolyses réalisées à l'échelle industrielle.

4.4. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est spécifique pour chaque protéase, dans des conditions opératoires données. De plus, les préparations enzymatiques commerciales sont composées de plusieurs fractions actives (Bjurlin *et al.*, 2002). C'est pourquoi il est important de quantifier l'activité protéolytique des enzymes. Il existe deux méthodes pour le faire :

- par dosage de l'azote soluble après digestion de protéines de référence (hémoglobine ou caséine dénaturée) (Adler-Nissen, 1986) ;

- par dosage des chromophores libérés suite à l'hydrolyse des substrats synthétiques (Mullally *et al.*, 1994).

Le premier type de mesure est le plus utilisé du fait que la plus grande partie des enzymes commerciales est caractérisée par cette méthode.

4.5. Les méthodes de contrôle du procédé de protéolyse enzymatique

Le paramètre de contrôle du procédé de protéolyse, le plus pratique et le plus convenable, celui qui représente assez bien l'évolution du procédé, est le degré d'hydrolyse (DH) (Adler-Nissen, 1986, Nielsen *et al.*, 2001). Le DH représente le degré d'avancement de la protéolyse et il est défini soit comme étant le pourcentage du nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre total et initial de liaisons peptidiques, soit comme étant le ratio entre l'azote non protéique et l'azote total (Mahmoud, 1994). Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le DH.

- La méthode à l'acide trichloracétique (TCA).

Avec cette méthode, l'azote non protéique libéré au cours de l'hydrolyse protéolytique est mesuré (Margot *et al.*, 1997). Le DH est calculé selon l'équation E 9 :

$$DH(\%) = \frac{(D_t - D_0)}{(D_{\max} - D_0)} \times 100 \quad (\text{E } 9)$$

où D_0 est l'azote non protéique soluble présent dans le substrat non hydrolysé, D_{\max} l'azote non protéique soluble total après hydrolyse, D_t l'azote non protéique au temps t .

- La méthode à l'acide tri-nitro-benzène-sulfonique (TNBS) ou à l'ortho-phthal(di)-aldéhyde (OPA).

Ces méthodes utilisent des composés spécifiques qui réagissent avec les groupements aminés en formant des chromophores quantifiables (Adler-Nissen, 1987). Les groupements α -aminés sont quantifiés par des techniques spectrophotométriques après réaction avec les réactifs TNBS ou OPA. Le DH est ainsi calculé (Eq. E 10) :

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (\text{E } 10)$$

où h est le nombre de liaisons peptidiques clivées et h_{tot} , le nombre total des liaisons peptidiques en meq.g^{-1} de protéine. La valeur de h_{tot} est calculée à partir du facteur de conversion Kjeldhal ($f_N = 6,25$ pour les protéines de colza (Roza *et al.*, 1997)) et de la masse molaire moyenne des résidus acides aminés (g.mole^{-1}) de la protéine. Cette valeur est connue pour certaines protéines alimentaires (caséine, viande, blé, etc.) et, en général, a une valeur de l'ordre de 8. Le h_{tot} de la caséine vaut 8,2, celui du blanc d'œuf est de 8,0, celui des protéines de blé 8,3 et celui des protéines de tourteau de colza vaut également 8 (Roza *et al.*, 1997). Ces méthodes sont très sensibles mais elles sont très chronophages (Silvestre, 1996).

- La méthode du pH-Stat.

Cette technique est basée sur le maintien du pH constant par titration continue et automatique des protons libérés au cours de l'hydrolyse. Le DH est calculé (Eq. E 11) selon deux façons. Si le pH réactionnel est au-dessus du pK_a des groupes α -NH alors :

$$DH(\%) = \frac{B \times N_b}{\alpha \times Mp \times h_{tot}} \times 100 \quad (\text{E } 11)$$

où B est la consommation de base (mL), N_b la normalité de la base (mole), α le degré moyen de dissociation de groupements α -aminés et Mp la masse de la protéine (g). Si le pH est en dessous du pK_a des groupes α -NH l'équation (Eq. E 12) devient :

$$DH(\%) = \frac{A \times N_a}{(1 - \alpha) \times h_{tot} \times Mp} \times 100 \quad (\text{E } 12)$$

où A est la consommation d'acide (mL), N_a la normalité de l'acide (Randriamahatody *et al.*, 2011). Le degré de dissociation de groupements $\tilde{\alpha}$ aminés (Eq. E 13) est fonction du pH et de la température de la réaction :

$$\alpha = (10^{\text{pH}-\text{pK}}) / (1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}) \quad (\text{E } 13)$$

La valeur de pK, à différentes températures (Kelvin), est calculée selon l'équation de Steinhard et Beychok (1964) (Eq. E 14) :

$$pK = 7,8 + \left(\frac{298 - T}{298 \times T} \right) \times 2400 \quad (\text{E 14})$$

Cette méthode est la plus employée parce qu'elle présente l'avantage d'être utilisée en continu, qu'elle n'est pas dénaturante et est très reproductible (Diniz et Martin, 1996).

- La méthode de l'osmométrie.

Le DH est calculé à partir de la conductivité et de l'osmolalité (Eq. E 15) :

$$DH(\%) = \frac{\Delta C \times (100 - D)}{S_o \times \omega \times h_{tot} \times 1000} \times 100 \quad (\text{E 15})$$

où ΔC est la variation de l'osmolalité mesurée en milliosmole, ω est le coefficient osmotique, S_o le pourcentage de la concentration en protéine et MS_t , le taux de matière sèche (%). C'est une méthode très efficace mais rarement utilisée (Adler-Nissen 1987).

Toutes ces méthodes sont assez différentes et, souvent, les valeurs de DH ne sont pas identiques ou comparables entre elles (Spellman *et al.*, 2003).

4.6. Mise en œuvre du procédé de protéolyse enzymatique

Une hydrolyse enzymatique peut être réalisée en réacteur discontinu ou continu (Lahl *et al.*, 1994).

4.6.1. Réacteur discontinu

Les procédés d'hydrolyse enzymatique en réacteur discontinu sont employés, en majeure partie, pour la production d'hydrolysats à l'échelle industrielle, en raison de leur facilité de mise en œuvre. C'est la méthode la plus répandue et elle est utilisée souvent pour optimiser le procédé de protéolyse. Cependant, le réacteur de type discontinu présente des inconvénients. La cinétique est lente, le procédé coûteux avec des rendements assez faibles (Perea et Ugalde, 1996 ; Mannheim et Cheryan, 1990). En fait, à la fin de la réaction une étape d'inactivation de l'enzyme est nécessaire. Elle peut se faire soit par augmentation de la température, soit par modification du pH afin de dénaturer la protéase, soit par élimination de

l'enzyme par des méthodes de filtration (UF), soit encore par ajout d'un inhibiteur de protéase. Les produits issus de ce type de procédé ne sont pas homogènes en taille.

4.6.2. Réacteur continu

Pour remédier aux inconvénients des réacteurs discontinus des systèmes de filtration des peptides sont associés aux réacteurs (Blatt, 1968 ; Bouhallab et Henry, 1995a). Avec ce type de système intégratif, les peptides, produits de la réaction, sont éliminés, ce qui évite d'éventuels phénomènes d'inhibition et, de plus, l'enzyme est retenu dans le réacteur. Ainsi, tout au long du procédé, une quantité constante d'enzyme est utilisée (Bouhallab et Henry, 1995b). Toutefois, la limite de ce type de réacteur est liée aux phénomènes de colmatage de la membrane d'UF et la perte d'activité de l'enzyme au cours du procédé. C'est pourquoi ce type de procédé est essentiellement utilisé à l'échelle du laboratoire.

4.7. Procédés de séparation des hydrolysats

Les hydrolysats obtenus sont des mélanges complexes constitués de peptides de taille variable, de minéraux, de composés azotés et antinutritionnels. Ces derniers, limitent leur utilisation notamment dans le domaine alimentaire, c'est pourquoi des procédés « post-hydrolyse » sont nécessaires pour l'adéquation des hydrolysats à des besoins fonctionnels, nutraceutiques, pharmacologique, etc. Ces procédés visent à contrôler la taille des peptides constituant les hydrolysats et l'élimination, ou tout au moins la réduction, de l'amertume induite par certains acides aminés ou composés antinutritionnels.

Les techniques d'UF sont les plus répandues pour l'élimination des peptides de grande taille moléculaire et la déminéralisation des hydrolysats (Jang et Lee, 2005). L'élimination, par UF, des molécules de haut poids moléculaire est fondamentale pour la production d'hydrolysats hypoallergéniques (Maldonado *et al.*, 1998). La séparation des hydrolysats par des techniques membranaires est utilisée surtout pour les procédés à l'échelle industrielle tandis que, les méthodes de « salting-out » et de chromatographie d'échange d'ions sont employées pour les applications à l'échelle du laboratoire. Parfois, ces techniques (MF, UF, NF et filtration sur gel) sont combinées pour l'enrichissement des hydrolysats de protéines (Kapel *et al.*, 2011). Tessier et ses collaborateurs (2006) ont appliqué les procédés

membranaires (ultrafiltration/nanofiltration) pour le fractionnement sélectif des différents peptides issus de protéines de colza (*Brassica campestris L.*). La chromatographie liquide à haute performance (CLHP), en particulier en phase inversée (CLHP-PI), est très efficace pour la séparation entre peptides et protéines. Elle fournit notamment des informations sur leur degré d'hydrophobie (Silvestre *et al.*, 1996).

4.8. Caractérisation des peptides

Après la séparation des peptides et l'élimination des molécules contaminantes par les techniques adéquates, les peptides sont caractérisés par des méthodes chromatographiques et/ou électrophorétiques (Tessier *et al.*, 2006). La chromatographie de phase inverse (CLHP-PI) et d'exclusion stérique (CLHP-ES), souvent couplées, sont plutôt utilisées pour l'analyse qualitative (hydrophilie et taille) des hydrolysats (Lemieux *et al.*, 1991).

Les méthodes d'estimation quantitative des hydrolysats peuvent être directes ou indirectes. Dans le premier cas, la quantité d'azote est estimée via la méthode de Kjeldhal ou par estimation des ions cupriques consommés par les hydrolysats (Silvestre., 1996). L'application de la méthode cuprimétrique, décrite par Lati *et al.* (1992), pour l'analyse d'hydrolysats de caséine a montré que la consommation d'ions cupriques (II) augmente avec le degré d'hydrolyse (Silvestre., 1996). Dans le deuxième cas, les hydrolysats sont caractérisés par une phase préalable de fractionnement. Les fractions sont ensuite analysées par des techniques spectrophotométriques (Silvestre, 1994). Cette approche se révèle plus adéquate et spécifique.

En résumé

La protéolyse enzymatique est bien connue pour la valorisation des protéines puisqu'elle permet la libération de peptides bioactifs. Néanmoins, le procédé qui en permet la mise en œuvre, est souvent mal maîtrisé, du fait de la variété des facteurs qui sont mis en jeu (pH, température, durée de la réaction), ainsi que la spécificité de la protéase. Ces paramètres ont une action non seulement sur la qualité des produits obtenus mais aussi sur le substrat de la réaction. Actuellement, cet aspect n'est pas pris en compte pour le contrôle du procédé. C'est pourquoi il apparaît qu'une évaluation quantitative de l'influence de l'état de dénaturation de la protéine sur le procédé d'hydrolyse enzymatique est une approche originale et nécessaire.

La complexité des hydrolysats produits représente une autre limite du procédé d'hydrolyse. La mise en place de techniques rationnelles de séparation pourrait permettre la simplification des étapes de purification des hydrolysats pour l'obtention de peptides à propriétés ciblées.

5. FONCTIONNALITES DES PEPTIDES

Les protéines du lait, d'œuf, d'origine animale ou végétale, représentent les sources les plus riches en peptides bioactifs potentiels (Clemente, 2000). A l'heure actuelle, les hydrolysats de caséine sont la source peptidique la plus importante, pour des applications nutritionnelles chez les humains. Ils sont commercialisés depuis un grand nombre d'années grâce à la vertu connue du lait, à la remarquable valeur nutritionnelle, à la disponibilité et au faible coût des caséines. Toutefois, depuis un peu moins de temps les protéines végétales connaissent un grand essor au niveau de leur utilisation dans de nombreuses formulations alimentaires en substitutions des sources animales. Chobert et ses collaborateurs (1996), par exemple, ont montré l'amélioration des qualités organoleptiques des aliments contenant des hydrolysats d'origine végétale. De nombreuses études ont été développées sur ces protéines afin d'en améliorer la valorisation (Vioque *et al.*, 2000 ; Chabanon *et al.*, 2007 ; Chabanon *et al.*, 2008 ; Tessier *et al.*, 2006 ; Aider et Barbana 2011).

5.1. Propriétés fonctionnelles

Les propriétés fonctionnelles des protéines sont définies comme étant les propriétés physiques ou physico-chimiques qui ont une incidence sur le comportement sensoriel de celle-ci dans les systèmes alimentaires (Kinsella, 1989). Parmi les propriétés physico-chimiques des hydrolysats des protéines on peut mentionner : la taille, la conformation, la composition en acides aminés, la séquence, la charge, le caractère hydrophobe et la stabilité structurale. Cette dernière dépend de l'environnement (pH, température, sels ou interactions avec d'autres molécules) (Sathe, 2002 ; Moure *et al.*, 2006).

L'amélioration de certaines propriétés fonctionnelles des hydrolysats, par rapport à la protéine initiale, est souvent due à leur taille réduite et à leur structure tertiaire simplifiée (Chobert *et al.*, 1996). Lors du clivage des liaisons peptidiques pendant la protéolyse, des changements importants se produisent. On peut citer, l'augmentation du nombre de groupements ionisables, la diminution de la longueur de la chaîne peptidique et une altération générale de la structure de la molécule (Phillips et Beuchat, 1981). De telles modifications sont responsables de l'augmentation de la solubilité, ce qui est fondamental pour la formation d'agents stabilisant les mousses, les émulsions et les gels. L'émulsion et la mousse sont des systèmes biphasiques dont l'une d'entre elles est dispersée dans une phase aqueuse (huile-eau et air-eau). D'après de nombreux travaux, le degré d'hydrolyse est déterminant pour définir la fonctionnalité d'un hydrolysate (Chobert *et al.*, 1988). Il a été montré qu'un faible DH augmente l'activité émulsifiante de la protéine native (Turgeon *et al.*, 1991 ; Vioque *et al.*, 2000). En effet, les grands peptides réduisent la tension interfaciale et stabilisent les émulsions. De plus, Mahmoud (1994) ont montré qu'il existe une corrélation directe entre le degré d'hydrophobie et l'activité émulsifiante. Dans ce contexte, la spécificité de l'enzyme joue un rôle fondamental pour la production d'un hydrolysate ayant de telles propriétés. En outre, certaines études supposent qu'il existe un optimum de masse molaire ou une longueur spécifique (inférieure à 20 acides aminés) des peptides pour assurer des bonnes propriétés émulsifiantes (Lee *et al.*, 1987 ; Kunst *et al.*, 2008).

Les mousses sont des systèmes colloïdaux présentant une phase liquide et une autre gazeuse. Les trois paramètres fondamentaux qui sont impliqués dans la stabilisation des mousses sont : la faible tension interfaciale, une viscosité élevée de la phase liquide et l'élasticité du film protéique (Kilara et Panyam, 2003). En général, lorsque le degré d'hydrolyse est modéré on peut aussi observer une augmentation des capacités moussantes

(Adler–Nissen, 1986). Il a été observé que les hydrolysats des globulines de colza présentent de meilleures propriétés moussantes que les hydrolysats d'albumine (Vioque *et al.*, 2000). Larré et ses collaborateurs (2006) ont montré que l'hydrolyse limitée (DH = 3 %), par la pepsine, d'un mélange de protéines de colza améliore leur pouvoir moussant et leur stabilité.

Les protéines de colza sont aussi considérées comme un ingrédient potentiel dans le système alimentaire grâce à leur capacité à former des gels. L'aptitude de ces protéines, ou de leurs hydrolysats à former des gels est définie comme leur concentration minimale nécessaire pour obtenir un gel solide (Moure *et al.*, 2006). Les travaux d'Aider et Barbana (2010) ont montré que l'activité enzymatique de la trans-glutaminase (TG) améliore le pouvoir gélifiant des protéines de Canola. On peut donc conclure que les propriétés fonctionnelles sont des caractéristiques très importantes pour l'exploitation des protéines ou de leurs hydrolysats dans le secteur alimentaire. Ainsi, les cruciférines et les albumines de colza sont donc potentiellement utilisables pour la conservation des viandes hachées, dans les produits de boulangerie, par exemple (Ghodsvali *et al.*, 2005).

5.2. Propriétés sensorielles

L'hydrolyse enzymatique peut conduire à la formation des peptides ayant un goût particulier (Gill *et al.*, 1996). Certains peptides possèdent un goût umami, reconnu et apprécié en Asie, et peuvent apporter une « nouvelle » saveur aux aliments. Les di-ou tri-peptides acides sont responsables de ce goût. En général, ils sont constitués par des résidus d'acides glutamique et aspartique liés avec des ions sodium (Gill *et al.*, 1996). Les travaux de Guo et de ses collaborateurs (2010) ont permis la formation d'arômes de viande à partir d'hydrolysats de colza (*Brassicaceae*).

Le procédé de protéolyse peut également conduire à la formation de peptides amers, ce qui est une contrainte pour leur valorisation dans le domaine alimentaire. L'amertume d'un peptide est surtout liée à sa composition en acides aminés hydrophobes. Ce goût évolue avec le degré d'hydrolyse. En général, il augmente avec l'accroissement du DH. C'est pourquoi le contrôle du DH est important pour limiter la production du goût amer. Plusieurs procédés sont employés pour l'élimination ou la réduction de l'amertume. Vioque et ses collaborateurs (1999a) ont utilisé une enzyme d'origine fongique (Flavourzyme[®]) pour éliminer de l'amertume dans des hydrolysats de colza. Toutefois, cette stratégie a conduit à la formation d'un nombre élevé d'acides aminés libres qui ont pour résultat de réduire le pouvoir

nutritionnel de l'hydrolysat. D'autres procédés utilisent les techniques chromatographiques, d'adsorption ou l'ajout des composés pour masquer le goût amer des peptides (Pedersen, 1994). Cependant, la complexité et la longue durée de ces techniques en limitent l'application.

5.3. Propriétés nutritionnelles

Un hydrolysat peut servir de complément alimentaire en vertu de son pouvoir nutritionnel. Il est connu que certaines personnes, surtout les enfants, présentent des dysfonctionnements au niveau de l'assimilation d'aliments contenant des protéines de haute masse molaire. L'altération du métabolisme peut être due soit à des allergies, soit au déficit d'enzymes digestives, c'est pourquoi un protéolysat peut être utilisé pour apporter le complément protéique chez de tels patients. Les hydrolysats du lactosérum sont les plus utilisés (Clemente, 2000). Cependant, les protéines végétales deviennent de plus en plus utilisées pour des applications variées (Maldonado *et al.*, 1998 ; Clemente *et al.*, 1999). Une étude montre la possibilité d'utiliser les hydrolysats des protéines végétales comme supplément dans les boissons ou des aliments liquides, grâce à leur haute solubilité (Vioque *et al.*, 1999a). Les hydrolysats peuvent aussi servir d'apport nutritionnel chez les patients souffrant de phénylcétonurie, d'hépatites ou en cas d'allergie alimentaire (Bautista *et al.*, 1996).

5.4. Propriétés biologiques

Les peptides bioactifs libérés lors de l'hydrolyse enzymatique sont constitués par des mélanges très différents et peuvent intervenir positivement dans de nombreux processus physiologiques chez l'homme (Meisel, 1997). Les peptides les plus étudiés sont les opioïdes, les antithrombotiques, les anti-ECA (Enzyme de Conversion de l'Angiotensine) les hypocholestérolémiantes, les antimicrobiens, auxquels on peut associer les antioxydants.

Les peptides opioïdes sont constitués par des courtes chaînes d'acides aminés. Ils agissent comme neuromédiateurs et modifient l'action d'autres neurotransmetteurs du système nerveux. Ils peuvent être d'origine endogène ou exogène. Dans le premier cas, ils sont produits et sécrétés par l'individu. Dans le deuxième cas, ils sont apportés par l'extérieur et sont d'origine alimentaire ou microbienne. Ces dernières sont appelées exorphines. Les plus connues proviennent du lait (casomorphines) et du gluten (gliadorphines). Ces peptides

réagissent avec des récepteurs spécifiques « μ , σ , κ , δ » et modulent certains comportements physiologiques chez l'homme. Les casomorphines, par exemple, sont absorbées, au niveau du système gastro-intestinal, sous forme de longues chaînes peptidiques et sont ensuite hydrolysées en petits peptides bioactifs dans le tissu intestinal. Alors, ils interagissent avec les récepteurs μ et δ et ils influencent le métabolisme postprandial (Smacchi et Giobetti, 2000). Des peptides opioïdes peuvent aussi être obtenus à partir des protéines végétales (gluten, gliadine, maïs orge, soja) (Smacchi et Giobetti, 2000).

La thrombose est une anomalie de la coagulation sanguine provoquée généralement par l'hyperviscosité du sang et un haut niveau des protéines hémostatiques (fibrinogènes). Les antithrombotiques, réduisent le risque de telles anomalies par la diminution de l'agrégation plaquettaire (Aider et Barbana, 2011). Certains peptides issus des protéines de colza montrent une activité antithrombotique (Zhang *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008) grâce à leur richesse en His, Pro, Trp, Tyr, Met, Cys et Phe. Il a été également démontré que ces peptides possèdent une activité inhibitrice sur la thrombine, enzyme qui catalyse la coagulation du fibrinogène, protéine responsable de la formation d'agrégats de fibrine.

Un groupe de biopeptides très important est celui des inhibiteurs de l'enzyme conversion de l'angiotensine (ECA). Cette enzyme, sécrétée par la rénine, est impliquée dans la régulation de la pression sanguine. Par conséquent, l'inhibition de l'ECA représente une alternative pour le traitement de l'hypertension (Chen *et al.*, 2009). Les protéines de colza, hydrolysées par l'Alcalase[®] et la protéase M « Amano » peuvent générer des peptides inhibiteurs de l'activité ECA (Wu *et al.*, 2008). De plus, ces fractions peptidiques sont résistantes à la dégradation des enzymes gastro-intestinales (trypsine et chymotrypsine). Yamada *et al.* (2010) ont isolé un peptide « rapakinin » (Arg-Ile-Tyr), issu d'un hydrolysat de colza et capable d'induire la vaso-relaxation dans les artères mésentériques chez des rats hypertensifs.

Les peptides de colza ont aussi montré une capacité hypocholestérolémiant (Yoshie-Stark *et al.*, 2006). L'hypercholestérolémie est caractérisée par l'accumulation du cholestérol LDL (low-density lipoprotiens) dans les vaisseaux sanguins qui est considérée comme la principale cause des maladies cardiaques et l'athérosclérose. Une prévention de cette maladie est le traitement par des agents hypolipidémiques, capables de se complexer aux acides

biliaires. Cela engendre une diminution du cholestérol, puisqu'il sert de substrat pour leur biosynthèse. Par conséquent, la concentration de cholestérol dans le sang se trouve réduite. C'est pourquoi l'activité hypocholestérolémiant des peptides est définie comme leur capacité à complexer les acides biliaires. Ma et Xiong (2009) ont observé une bonne capacité hypocholestérolémiant des protéines végétales, après hydrolyse par la pepsine et la pancréatine. La taille de ces peptides est variable.

Les peptides à activité antimicrobienne sont en général de petite taille, polycationiques, caractérisés par une structure amphiphile et riches en hélice α (Tossi *et al.*, 2000). Ces caractéristiques structurales permettent à ces peptides de se fixer sur la membrane du microorganisme en créant des perturbations au niveau des échanges membranaires. Un autre mécanisme d'action de ces peptides est l'inhibition du rôle des protéines impliquées dans le métabolisme bactérien (Erand et Vogel, 1999 ; Biziulevicius *et al.*, 2006). Parmi les protéines/peptides d'origine végétale, à activité antimicrobienne on retrouve les albumines 2 S (issues d'oléagineux), les lectines, les patatines et les sporamines (issues des pommes de terre). Plusieurs études ont montré une activité des albumines contre *Pseudomonas aeruginosa* (Gram +), responsable d'infections respiratoires et contre *Bacillus (subtilis et cereus)* pathogènes des aliments (De Souza *et al.*, 2011). Une activité antifongique (Barciszewski *et al.*, 2000 ; Da Costa *et al.*, 2007) et antimicrobienne (Ribeiro *et al.*, 2007) a été démontrée pour les napines de *Brassicaceae*. En général, le mécanisme d'action de ces peptides n'est pas bien connu. Cependant, l'hypothèse la plus probable est la perméabilisation de la membrane du microorganisme (Terras *et al.*, 1993a ; Terras *et al.*, 1993b ; Agizzio *et al.* 2006).

Les peptides à propriétés antioxydantes sont employés pour la prévention de processus de peroxydation. Cette réaction provoque la production de radicaux libres qui endommagent des molécules biologiques essentielles, notamment l'ADN. Xue et ses collaborateurs (2009) ont montré qu'un hydrolysat de protéines de colza, issus de l'action de l'Alcalase[®] et du Flavourzyme[®], a une action antioxydante dose-dépendante. De plus, il inhibe l'auto-hémolyse des globules rouges. Le peptide le plus antioxydant, Pro-Ala-Gly-Pro-Phe, a été identifié par Zhang *et al.* (2008). Ces peptides correspondent aux résidus aminés 38-42 des napines.

Les cellules de mammifères sont employées pour la production d'anticorps monoclonaux, d'hormones, de protéines recombinantes et de tissus humains (Amiot *et al.*, 2004). Ces cellules sont cultivées dans des milieux complexes et spécifiques. Les milieux de culture des cellules animales nécessitent une source d'azote pour garantir leur croissance. Une telle source azotée est, en général, apportée par du sérum de veau foetal, produit très complexe, de composition méconnue et variable selon le lot de provenance mais aussi très coûteux. De plus, l'emploi du sérum présente le risque d'introduire, dans le milieu, des contaminants, notamment des mycoplasmes, virus et prions (Kunst, 2000). D'où l'exigence de remplacer cette source d'azote par d'autres alternatives d'origine non animale. A partir des années 60, le sérum de veau foetal a commencé à être substitué par différents types d'hydrolysats. Parmi eux, des hydrolysats de protéines de lait (caséines, lactalbumine), de viande ou issues de microorganismes (extrait de levure et peptones) (Amiot *et al.*, 2004 ; Mosser *et al.*, 2012). Récemment, des études ont montré que certains hydrolysats de protéines végétales pouvaient remplacer le sérum dans le milieu de culture. Les hydrolysats de blé et de soja peuvent stimuler la croissance des cellules de mammifères comme les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), d'ovaire de bébé Hamster (BHK), de reins de singe vert (Vero), d'insectes (sf9) et parfois aussi la production des molécules d'intérêt par ces cellules (Keen et Rapson, 1995 ; Blom *et al.*, 1996 ; Franek *et al.*, 2000). Toutefois, il a été mis en évidence que ces nouveaux milieux provoquent une perturbation chez les cellules par rapport à celles cultivées dans les milieux classiques, ce qui provoque une apoptose plus rapide. Franek (2004) a isolé des peptides de blé ayant une capacité anti-apoptotique. L'inconvénient principal d'un hydrolysat végétal est sa complexité liée à la présence de molécules d'origine non protéique. Franek *et al.* (2000) ont montré que l'action sur la croissance et la production des molécules recombinantes est différente selon la fraction peptidique utilisée. Cela met en évidence l'hétérogénéité dans l'activité des différents composés. Le mécanisme d'action des hydrolysats sur la croissance des cellules animales n'est pas encore bien élucidé. Néanmoins, il est supposé que les peptides qui ont une influence, présentent une taille inférieure à 2500 Da (Mosser *et al.*, 2012). Il est présumé aussi que ces petits peptides, surtout ceux riches en glutamine, participent à la valeur nutritionnelle du milieu (Blom *et al.*, 1996). Selon Franek *et al.*, (2004), les peptides agissent comme des facteurs de croissance en stimulant la production de molécules qui activent ou inhibent la croissance cellulaire. Un autre rôle potentiel des peptides, notamment le Arg-Gly-Asp et le Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg, peut être de favoriser l'attachement des cellules adhérentes. Cela permettrait une meilleure distribution cellulaire à

la surface des boîtes de culture et, par conséquent, une meilleure croissance (Amiot *et al.*, 2004).

En résumé

Les peptides actifs qui sont responsables du large potentiel d'actions biologiques, ont des caractéristiques physico-chimiques spécifiques (taille, hydrophobie, hydrophilie, charge, etc.). Les propriétés qualitatives du substrat d'origine apparaissent donc essentielles pour l'obtention de ces peptides. C'est pourquoi, si l'état structural initial du substrat peut être maîtrisé, il pourrait agir comme un paramètre permettant d'orienter l'apparition, ou non, de certains peptides à activité ciblée.

Les peptides issus des protéines de colza, en mélange ou sous forme d'isolats, ont un large potentiel d'application dans plusieurs domaines : l'alimentaire et les produits liés à la santé. La validation de certaines propriétés biologiques importantes de ces peptides est un fait très prometteur pour des applications dans les-dits domaines.

6. L'OPTIMISATION

L'optimisation est un processus qui cherche à analyser qualitativement et quantitativement les problèmes qui ont pour but de déterminer le « meilleur » élément d'un ensemble, au sens d'un critère donné. L'optimisation d'un procédé peut être réalisée à partir de différentes démarches :

1. la modélisation, quelle qu'en soit son type (boîte noire, grise, blanche...), à partir du moment où les modèles permettent de représenter l'influence des paramètres cinétiques ou des variables opératoires d'un procédé dans le domaine exploré. Les modèles de type boîte grise, ou ceux dits de connaissance sont les plus performants et les mieux adaptés pour cette démarche ;
2. l'application de plans d'expériences, qui permettent d'explorer, soit de manière grossière, soit de façon plus exhaustive, un domaine dans lequel un optimum devrait se situer.

Nous nous intéresserons plus particulièrement à cette dernière approche qui correspond aux exigences de l'étude réalisée dans ce mémoire. Pour cela, dans un premier temps, il s'agit de

définir le(s) paramètre(s) facteur(s) susceptibles d'avoir une incidence sur un (des) critère(s) choisi(s) par l'expérimentateur, ainsi que son (leurs) domaine(s) d'investigation. Les expériences réalisées permettent de déterminer et de lister le(s) facteur(s) important(s) par rapport au(x) critère(s) choisi(s). L'influence du (des) facteur(s) sur la (les) valeur(s) de(s) critère(s) est ensuite modélisée en choisissant une classe de modèles appropriés. Les coefficients du modèle seront ensuite optimisés à l'aide d'outils adaptés afin de faire coïncider les réponses du modèle avec les données observées (expérimentales).

6.1. Les plans d'expériences

Les plans d'expériences ont pour objet, si possible, la recherche d'effets croisés de plusieurs facteurs variables simultanément. L'interprétation se fait à partir de l'ensemble des résultats. Cette démarche est donc différente de l'approche classique où l'effet et l'interprétation des différents paramètres est étudié de manière séquentielle en changeant la valeur ou le niveau d'un seul facteur à la fois, d'un essai à l'autre (Schimmerling *et al.*, 1998). Les plans expérimentaux peuvent être appliqués par des criblages ou par des méthodes de surface de réponse (MSR). Dans le premier cas, il est possible de déterminer les facteurs qui ont une influence statistique significative sur les variations de la réponse. Dans le deuxième cas, ces variations sont calculées (étude quantitative) en fonction des facteurs jugés influents. De ce fait, il est important de préciser que la mise en œuvre d'un modèle dépendra du plan d'expériences utilisé.

6.2. Méthode des surfaces de réponse (MSR)

Ce type de plan permet de décrire l'évolution de la réponse pour un nombre limité de facteurs, qui doivent tous être quantitatifs et continus. Les informations obtenues se présentent sous forme de surfaces de réponse ou de courbes d'iso-valeurs associées. Ces dernières définissent les zones admissibles pour les facteurs, pour lesquelles la réponse est stable. La modélisation dans le cas des MSR est faite par des plans de type composite centré (Figure 15). (Schimmerling *et al.*, 1998 ; Box et Draper, 1987).

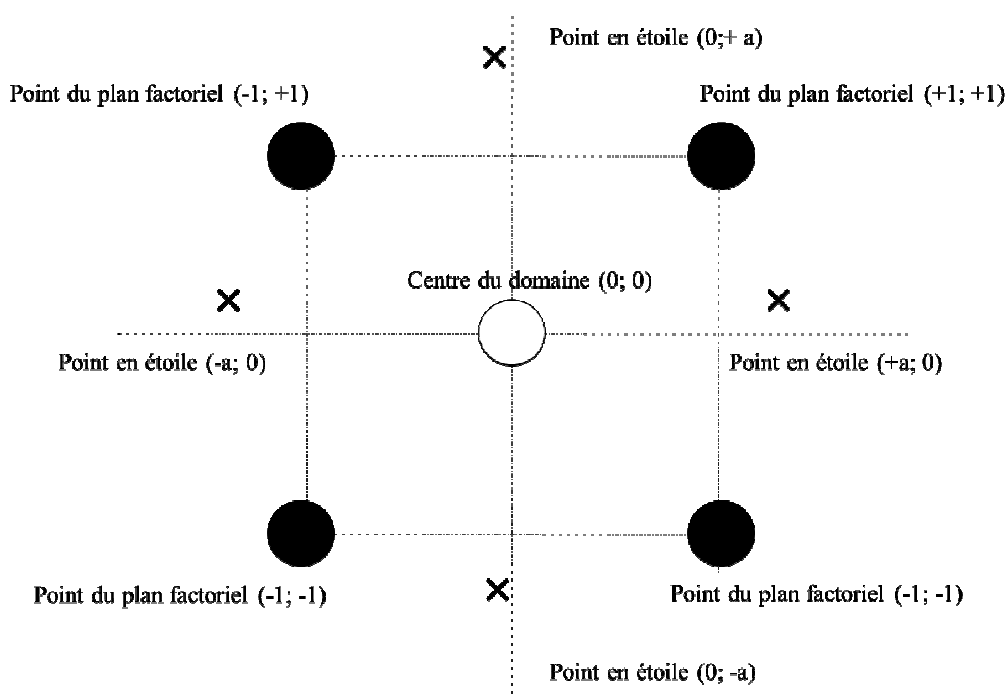


Figure 15. Structure schématique d'un plan composite centré.

Dans ce genre de plan, les facteurs sont quantitatifs et le modèle a une forme quadratique. Les matrices expérimentales sont la résultante d'une combinaison entre un plan expérimental factoriel à 2 niveaux (-1 ; +1), une matrice axiale composée (toutes les combinaisons +a ou -a pour un facteur) et un point central répété (5 ou 6 fois) au centre du domaine. Ces points centraux permettent d'estimer la variance et la variabilité naturelle (σ^2) au sein du plan (Myers *et al.*, 2009). Le nombre d'expériences est aléatoire et dépend du nombre de facteurs. Ces plans sont adaptés à une démarche séquentielle, c'est-à-dire que l'on va d'abord étudier les effets principaux ainsi que leurs interactions, et si les points au centre du domaine montrent une répétabilité significative, l'étude peut se poursuivre avec les points axiaux. Ces plans sont très robustes mais représentent une méthode lourde quant au nombre d'essais. C'est pourquoi dans le cas d'études impliquant plus de six facteurs, d'autres types de plans seront favorisés.

Les plans d'expériences sont caractérisés par certaines propriétés fondamentales qui déterminent la matrice expérimentale et la modélisation déduite :

- l'orthogonalité, ce qui implique que les coefficients du modèle soient corrélés entre eux et ceux estimés, soient les plus précis possible ;

- la variance maximale qui est un indice de qualité de la matrice utilisée ;
- l'isovariance par rotation c'est-à-dire que la variance de précision du modèle reste inchangée quelle que soit la rotation des axes de référence ;
- la précision uniforme, s'il y a quasi absence de variation entre valeurs prédites et observées dans la majorité du domaine expérimental (DE) (Schimmerling *et al.*, 1998).

Après la réalisation du plan d'expériences, il est important d'analyser les résultats afin d'estimer les coefficients du modèle pour chaque réponse et leur validité. La variance et la variabilité déterminent la qualité du modèle. La variance des répétitions est l'estimation la plus objective de la variabilité naturelle du plan. Le rapport des variances estimées par plusieurs conditions suit la loi de « Fisher-Snedecor » (Eq. E 16) :

$$F_{\text{exp}} = \frac{V(A)}{V(e)} \quad (\text{E 16})$$

où $V(A)$ et $V(e)$ sont l'estimation de la variance d'un essai associé à l'action d'un facteur ou l'effet des répétitions sur un phénomène. Cette loi dépend des degrés de liberté des variances estimées du rapport F_{exp} . Des valeurs critiques existent (F_{crit}) dans des tableaux prédéfinis. Ces valeurs vont délimiter les bornes supérieures du domaine dans lequel il y a une forte probabilité de retrouver F_{exp} dans le cas où les hypothèses de normalité de la réponse ($1-\alpha$) ou de nullité des effets (α) sont satisfaites (Schimmerling *et al.*, 1998).

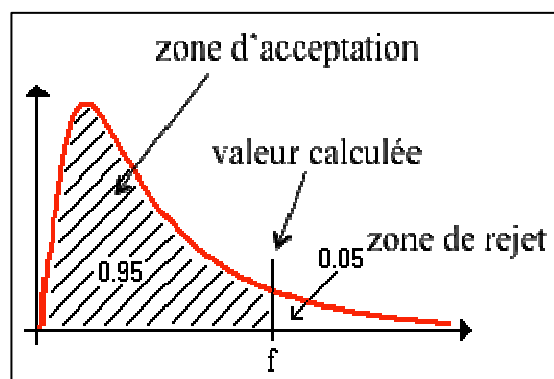


Figure 16. Principe de la loi de Fisher-Snedecor.

Le test de « Fisher-Snedecor » (Figure 16) est employé pour déterminer l'importance des effets des paramètres. Pour pratiquer ce test, il faut fixer, a priori, le niveau de confiance (95 % ou 99 %), calculer le rapport F_{exp} pour un paramètre et grâce au tableau de Fischer-Snedecor, il est alors possible de déterminer F_{crit} . Deux cas peuvent se présenter :

- 1) si $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$, les effets liés au paramètre considéré ne sont pas significatifs et donc considérés comme nuls ;
- 2) si $F_{\text{exp}} \geq F_{\text{crit}}$, les effets sont significatifs.

Certains logiciels de statistique associent souvent F_{exp} à une probabilité critique (P_{crit}) correspondant à la probabilité que $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$. Dans ce cas, P_{crit} peut avoir deux valeurs :

- 1) $P_{\text{crit}} > 0,05$: paramètre non significatif ;
- 2) $P_{\text{crit}} < 0,05$: paramètre significatif.

Après avoir défini qualitativement (« significativité ») et quantitativement (réponse de surface) un modèle il est possible d'appliquer un critère d'optimalité.

6.3. Méthodes d'optimisation

A partir des différentes conditions issues d'un plan expérimental, il est possible de sélectionner des solutions répondant à certaines exigences afin de maximiser ou de minimiser un ou plusieurs critères (objectifs) bien défini(s) (rendement, productivité, concentration d'un produit, coût d'opération, etc.) (Fonseca et Fleming, 1993). Il existe de nombreuses méthodes d'optimisation. Elles sont classées en deux groupes principaux : les méthodes statiques et les méthodes dynamiques. Dans le premier cas, les paramètres à optimiser ont des valeurs constantes pendant toute la durée du procédé. Ce genre d'optimisation s'adapte bien aux procédés qui ne dépendent pas du temps. Dans le cas contraire, on parle d'optimisation dynamique.

Selon les caractéristiques d'analyse de la méthode, on identifie des méthodes déterministes (MOD) et non déterministes (MOS). Les MOD se dichotomisent en deux sous-groupes : les méthodes fondées sur le calcul, dont font partie les méthodes directes et indirectes, et les méthodes énumératives. Les premières sont utilisées pour des problèmes d'optimisation où il n'existe qu'une seule solution locale mais présentent le désavantage d'une faible robustesse. Les méthodes énumératives, au contraire, sont caractérisées par leur robustesse. Ceci est dû au fait que l'algorithme appliqué considère chaque valeur de la fonction à optimiser en chaque point de l'espace.

De nombreux algorithmes ont été développés pour ce type d'optimisation (Banga *et al.*, 2003). Cependant, les plus complexes sont traités par des méthodes d'optimisation non déterministes ou stochastiques (MOS). Ces dernières permettent d'explorer efficacement l'espace de recherche (Beasley *et al.*, 1993). Elles sont utilisées dans les cas où l'algorithme polynomial de résolution temporelle n'est pas connu et pour lesquels on veut trouver une solution approchée de l'optimum global. Ces systèmes (boîtes noires) ne nécessitent aucune connaissance du problème traité. Les MOS sont définis suivant l'approche retenue. Elles peuvent être :

- adaptative : application dans tous les domaines, notamment électriques et mathématiques (Magalas et Malinowski., 2003 ; Banga *et al.*, 2003) ;
- évolutionnaire : suivant l'évolution biologique darwinienne. Les générations d'individus qui s'« adaptent » sont considérées comme les meilleures solutions (Goldberg et Samtani, 1991) ;
- par clustering ou regroupement : méthodes permettant de déterminer la proximité des optimums locaux évitant ainsi la répétition de la détermination d'une même solution (Banga *et al.*, 2003) ;
- par la méthode de la descente rapide : a partir d'une solution initiale, une nouvelle configuration est tentée en effectuant aléatoirement une modification de la référence (Maouche *et al.*, 2000).

Ces méthodes sont choisies et appliquées de manière libre par l'expérimentateur et prennent en compte les objectifs à atteindre. Elles peuvent toutes se révéler adaptées mais ne sont pas nécessairement universelles (Wolpert et Macready, 1997). Les méthodes stochastiques peuvent traiter différents types de problèmes d'optimisation, qu'ils soient monocritères ou multicritères.

6.3.1. Optimisation multicritère

L'optimisation classique a comme objectif l'obtention d'une seule solution, elle est dite monocritère. Cette approche est différente de l'optimisation multicritère (multi-objectif) (OM) où les différents critères n'ont pas un optimum au même endroit. Il est nécessaire, pour certains procédés, de maximiser certains objectifs (productivité, rendement, qualité des produits, etc.) et d'en minimiser d'autres (coût, temps, etc.). Ce type d'optimisation, dont les objectifs sont antagonistes, implique la recherche d'un compromis (Tan *et al.*, 2003). De ce fait, il existe deux méthodes pour l'étude du problème, soit par combinaison des critères, soit

par formulation de contraintes. Dans le premier cas, une combinaison linéaire de critères pondérés est construite (Trelea *et al.*, 2004). Le désavantage de ce type d'approche est que la solution du problème va dépendre du choix des attributs aux critères. Dans le deuxième cas, un seul critère est choisi à titre d'objectif principal, tous les autres sont considérés comme des contraintes (Massebeuf *et al.*, 2003). L'inconvénient de cette méthode est la justification du choix du critère à optimiser par rapport aux autres, établis comme contraintes (Sarkar et Modak, 2004a et b). La principale difficulté d'un problème multicritère est donc qu'il n'existe pas de définition précise de la solution optimale. Le décideur peut simplement exprimer le fait qu'une solution soit préférable à une autre en fonction des objectifs.

Les optimisations multicritères sont retrouvées dans plusieurs domaines comme le génie chimique (Silva et Biscaia, 2003), les procédés alimentaires (Coelho, 2010) et les procédés biotechnologiques (Muniglia *et al.*, 2004 ; Dietz *et al.*, 2006).

Le paragraphe suivant traitera de l'optimisation multicritère ainsi que du traitement des solutions obtenues et des algorithmes appliqués.

6.3.2. Domaine de Pareto et algorithmes génético-évolutionnaires

Vilfredo Pareto formule le concept que « dans un problème multiobjectif, il existe un équilibre tel qu'il n'est pas possible d'améliorer un critère sans détériorer au moins un des autres critères ».

La « solution optimale » au sens de Pareto définit une solution obtenue à l'aide d'une optimisation multicritère si elle n'est dominée par aucune autre. Les solutions non dominées, dans leur ensemble, sont « Pareto - optimales ». Elles sont représentées par une surface dénommée « zone de Pareto » (Geoffrion *et al.*, 1972), tandis que l'espace des critères est connu sous le nom de « front de Pareto ». L'ensemble de solutions optimales au sens de Pareto est obtenu, en général, par les algorithmes évolutionnaires (AE) (Perrin *et al.*, 1997; Muniglia *et al.*, 2004). Les AE sont divisés en deux groupes :

- les approches non basées sur l'optimalité de Pareto (Schaffer, 1985). Les objectifs sont traités séparément en évolution et des solutions non dominées sont obtenues ;
- les approches basées sur l'optimalité de Pareto (Goldberg et Holland 1988). La dominance au sens de Pareto est utilisée pour exploiter la zone de recherche du front de Pareto. Toutes les conditions au sens de Pareto sont considérées.

Un algorithme génético-évolutionnaire appartient à cette dernière catégorie (Muniglia *et al.*, 2004). Ce type d'approche est souvent employé pour des problématiques « difficiles » et

fournit un ensemble de solutions à caractère stochastique. Le principe de l'algorithme génético-évolonnaire est basé sur la métaphore biologique de l'évolution de Darwin. Une population (ensemble de solutions) est confrontée à l'environnement sélectif (fonction d'évaluations). Les individus des populations les plus adaptés (solutions évaluées optimales) se reproduisent plus facilement et survivent aux sélections (transmissions de leurs patrimoines). Ces méthodes possèdent l'avantage d'être applicables dans la plupart des problèmes d'optimisation (multimodaux, non continus, multiobjectifs, dynamiques, etc.), et conduisent à des résultats exploitables et interprétables par le décideur. Toutefois, leur base théorique est insuffisante et n'offre aucune garantie de trouver l'optimum en un temps fini.

L'application de l'algorithme génético-évolonnaire permet de rassembler toutes les solutions satisfaisantes pour lesquelles on pourra effectuer un classement. Le choix final est laissé au décideur. Toutefois, ce choix peut être facilité si l'on intègre, par la suite, des outils de génie décisionnel qui conduisent à « automatiser » la sélection d'une solution (choix) à partir de règles définies (Viennet *et al.*, 1996).

En résumé

Les essais classiques, effectués de manière séquentielle, en faisant varier les facteurs indépendamment l'un de l'autre, ne permettent pas d'optimiser des processus complexes. L'inconvénient de cette approche est qu'elle ne conduit pas à une exploration de toutes les solutions et qu'elle ne considère pas l'interaction entre plusieurs facteurs. C'est pourquoi, l'utilisation de plans d'expériences devient un outil très important pour la maîtrise des facteurs affectant un procédé. A partir des résultats quantitatifs issus d'un plan d'expériences, il est possible de sélectionner la « meilleure solution » répondant aux critères de performance choisis, souvent antagonistes. L'approche par optimisation multicritère est en adéquation avec l'ensemble des problèmes à résoudre dans le cadre de ce travail ; elle doit permettre d'évaluer l'influence et les interactions des facteurs sur le procédé d'extraction sélective de napines. Par ailleurs, les outils du génie décisionnel devraient aider le décideur à choisir la solution retenue.

MATERIEL & METHODES

MATERIEL & METHODES

1. OBTENTION D'UN ISOLAT DE NAPINES DE TOURTEAU DE COLZA INDUSTRIEL	63
1.1. Optimisation du procédé d'extraction sélective de napines par plan d'expériences	63
1.1.1. Etude préliminaire	63
1.1.2. Optimisation multicritère	64
1.1.3. Réalisation des essais	65
1.1.4. Modélisation	66
1.1.5. Optimisation multicritère par algorithme génético-évolonnaire	67
1.2. Analyse de l'extrait de napines	68
1.2.1. Dosage des protéines par la méthode Kjeldhal	68
1.2.2. Electrophorèse sur Gel : SDS-PAGE	69
1.2.3. Dosage des glucides par la méthode de Nelson-Somogyi	70
1.2.4. Dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu	71
1.3. Purification de l'extrait de napines	71
1.3.1. La précipitation au sulfate d'ammonium	71
1.3.2. Chromatographie d'exclusion stérique sur colonne G-25	72
1.3.3. Purification de l'extrait des napines à l'échelle pilote	72
1.3.4. Chromatographie liquide haute performance sur colonne de phase inverse C4	74
2. ANALYSE STRUCTURALE DES NAPINES EXTRAITES	75
2.1. Séquençage N-terminal	75
2.2. Détermination des structures secondaire et tertiaire de napines	76
2.3. Etude de la structure de napines par dichroïsme circulaire (DC)	76
2.4. Etude de la structure tertiaire de napines par fluorescence	77
2.5. Etude de la température de dénaturation des napines par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	78
3. PROTEOLYSE ENZYMATIQUE	80
3.1. Le substrat protéique	80
3.2. Les protéases sélectionnées	80
3.2.1. L'Alcalase® 2,4 L	81
3.2.2. La pepsine	81
3.3. Evaluation de l'activité protéolytique par la méthode Anson	81
3.4. Mise en œuvre de la protéolyse	82
3.5. Séparation des mélanges peptidiques par chromatographie haute performance en phase inversée (CLHP-PI)	86
4. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES DE NAPINES ET DES HYDROLYSATS OBTENUS	86
4.1. Propriétés biologiques	86
4.1.1. Test antifongique sur <i>Fusarium langsethiae</i>	87
4.1.2. Test antimicrobien sur <i>Bacillus Coagulans</i>	87
4.1.3. Impact de napines et de leurs hydrolysats sur la croissance des cellules animales	88
4.2. Propriétés fonctionnelles des napines et de leurs hydrolysats	89
4.2.1. Propriétés moussantes et stabilité des mousses	89
4.2.2. Propriétés émulsifiantes et stabilité des émulsions	90
	62

1. OBTENTION D'UN ISOLAT DE NAPINES DE TOURTEAU DE COLZA INDUSTRIEL

Le tourteau de colza (variété double 0) utilisé dans cette étude est issu d'une extraction à l'hexane d'huile industrielle (Robbe-Novance - Compiègne, France). Afin d'homogénéiser la taille des particules, le tourteau a été tamisé (tamis : Osi Afnor NFX 11504) jusqu'à obtenir une farine de granulométrie inférieure à 1 mm. Il est composé par de l'eau (8 %), de l'huile résiduelle (3 %), des protéines (38 %) et pour les 51 % (p/p) restants, il est constitué de cellulose, polyphénols et minéraux.

1.1. Optimisation du procédé d'extraction sélective de napines par plan d'expériences

1.1.1. Etude préliminaire

L'étude préliminaire, destinée à déterminer le niveau d'influence de différents facteurs lors de l'extraction solide-liquide des napines, a été effectuée en fioles d'Erlenmeyer. Les mesures de pH ont été effectuées avec un pH-mètre de type HPM 62 Standard, Radiometer. Toutes les mesures de dosage des protéines ont été évaluées selon la méthode de Kjeldahl. L'étude séquentielle de l'influence des différents facteurs sur la sélectivité du procédé d'extraction a été réalisée en intégrant, à chaque étape, les valeurs des facteurs donnant les meilleurs résultats.

- **Impact du pH**

Pour évaluer l'impact du pH sur l'extraction des napines, une solution à 5 % (g/g) de tourteau est solubilisée dans de l'eau osmosée. Différentes solutions, avec un pH allant de 2 à 11, ont été placées dans des fioles à température ambiante et agitées pendant 30 mn. Des solutions d'HCl 5 N (Carlo Erba) et de soude 1N (Carlo Erba) ont été utilisées comme acide et base pour l'ajustement du pH. La séparation solide-liquide a été effectuée par centrifugation du mélange à 13.200 x g (Beckman, J2-21 Centrifuge, E.U. d'Amérique) pendant 30 mn à température ambiante. Le culot est écarté et le surnageant (appelé extrait) est conservé à -20

°C avant d'être analysé par la méthode de Kjeldahl et SDS-PAGE. Par la suite, les expériences ont été réalisées à pH 2.

- Impact du ratio tourteau/eau

Différentes concentrations en tourteau (de 3 % à 18 %) ont été préparées pour déterminer l'impact du ratio farine/eau. Un titre en tourteau égal à 18 % représente une limite à ne pas dépasser parce que les paramètres d'extraction deviennent incontrôlables (pH, agitation, etc.). Comme mentionné précédemment, les mélanges sont agités pendant 30 mn à température ambiante puis centrifugés. Le meilleur résultat est obtenu à 12 %.

- Impact de la durée de réaction

L'influence de la durée de la réaction est évaluée à température ambiante pendant 60 mn. La quantité de protéines extraites a été observée après 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 mn. 15 mn sont suffisantes pour obtenir le meilleur résultat.

- Impact de la force ionique

L'extraction des napines est déterminée par l'utilisation de trois sels à différents degrés d'effet chaotropique (suivant la série d'Hofmaister). Afin d'augmenter l'interaction entre les molécules d'eau et les napines, les sels choisis sont : le chlorure de sodium (NaCl), le chlorure de calcium (CaCl₂) et le chlorure de magnésium (MgCl₂). Différentes extractions contenant ces sels à une concentration finale de 0,5 M et 1 M ont été ensuite effectuées.

(Fournisseur des sels : Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier)

- Impact de la température

L'influence de la température a été évaluée pour des températures de 25 °C, 40 °C, 50 °C et 65 °C. Les réactions se sont déroulées dans un petit réacteur de 100 mL à double enveloppe, réglés à l'aide d'un bain thermostaté (Polystat 11, BioblockScientific, Illkirch, France). Une analyse qualitative en SDS-PAGE a été réalisée pour confirmer la sélectivité du procédé d'extraction.

1.1.2. Optimisation multicritère

Afin d'évaluer l'effet conjugué des tous les facteurs (pH, titre en tourteau, température et durée de la réaction) ayant une influence sur le procédé d'extraction des napines, un plan

expérimental a été mis en œuvre. Une telle approche d'optimisation a pour but de définir les conditions opératoires les plus performantes en termes de quantité de napines extraite sélectivement, de pureté par rapport à la matière sèche de l'extrait et de rendement. Par ailleurs, deux autres critères (qualitatif et économique) ont été considérés : l'association polyphénols/protéines ainsi que la quantité d'acide employée pendant le procédé d'extraction.

Le plan expérimental appliqué est du type central centré composite « FCCC » (Face centered central composite design) ; il comprend 29 expériences qui mettent en relation les quatre facteurs à étudier, à trois niveaux (tableau 2).

Tableau 2. Matrice du plan central composite (FCCC).

N°d'essai	Facteurs			
	pH (X ₁)	titre en tourteau (%) (X ₂)	T ° C (X ₃)	duré de réaction (mn) (X ₄)
1	2	15	65	10
2	3	9	45	15
3	2	3	25	10
4	2	15	25	10
5	3	9	45	15
6	3	9	25	15
7	2	15	65	20
8	2	3	65	10
9	4	3	25	10
10	2	15	25	20
11	3	9	45	15
12	2	3	65	20
13	2	9	45	15
14	3	9	45	10
15	4	9	45	15
16	3	9	45	15
17	3	9	45	20
18	3	9	65	15
19	4	3	25	20
20	4	3	65	10
21	4	3	65	20
22	2	3	25	20
23	3	9	45	15
24	4	15	65	10
25	4	15	25	10
26	3	15	45	15
27	3	3	45	15
28	4	15	25	20
29	4	15	65	20

1.1.3. Réalisation des essais

Les extractions sont réalisées en réacteur de 5 L (Applikon, Bio Controler ADI 1030, Saint-Paul-Trois-Châteaux) (Figure 17). Le tourteau de colza et l'eau sont mélangés en différentes proportions, selon les distinctes conditions du plan expérimental. Un bain

thermostaté (Julabo F10, Pays Bas) permet la régulation de la température par circulation d'eau dans la double enveloppe qui entoure le réacteur. Le pH est maintenu à la valeur de consigne par ajout d'HCl 5 N (régulation à 0,02 unité pH près). Le dispositif d'agitation comprend un système de deux contre-pales fixes et trois turbines Rushton associées à un arbre entraîné par un moteur situé au-dessus de la cuve en verre. La vitesse de rotation est fixée à 400 tr/mn. Le schéma de l'installation est représenté dans la figure 18. Les extraits obtenus sont centrifugés pendant 30 mn à 13.200 g (Beckman, J2-21 Centrifuge, E.U. d'Amérique) et ensuite clarifiés sur un double filtre de 0,8-0,4 μm (Sartopore 2 Mini Cartridge, Goettingen, Allemagne).

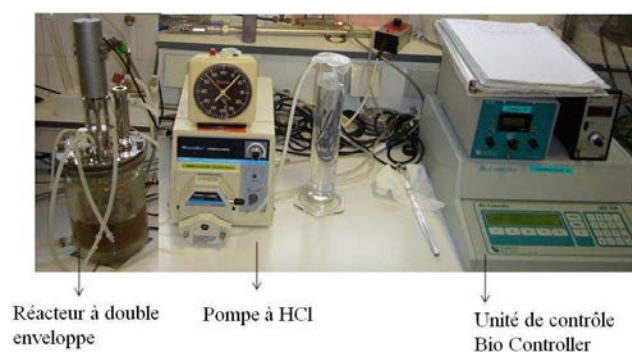


Figure 17. Photographie du système d'extraction.

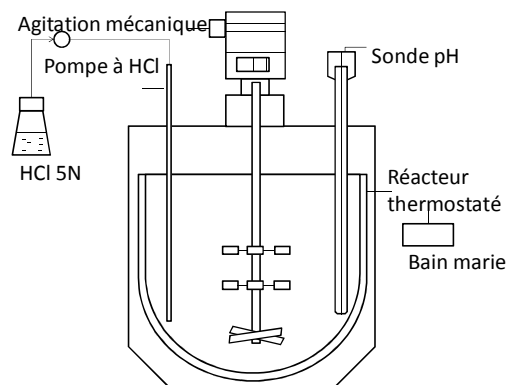


Figure 18. Schéma du réacteur et de ses accessoires.

1.1.4. Modélisation

Dans cette étude, l'application de la régression des moindres carrés (PLS), a permis d'obtenir un modèle polynômial d'ordre 2, exprimé comme suit (Eq. E 17):

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ j < i}}^n a_{ij} X_i X_j \quad (\text{E 17})$$

Où Y est le critère mesuré, a_0 une constante, a_i et a_{ij} sont les coefficients du modèle, n est le nombre de facteurs et $X_i X_j$ les interactions entre facteurs. R^2 et le « lack of fit » ($p > 0,05$) sont utilisés pour évaluer la fiabilité et la qualité de représentation du modèle. La répétition de chaque mesure permet de déterminer la variance de chaque indicateur modélisé. La validation du modèle est vérifiée par l'analyse des coefficients a_i de la régression pour caractériser la corrélation entre les valeurs expérimentales et modélisées. À ce niveau, il devient possible d'estimer la variance des coefficients. Les incertitudes sur les coefficients a_i , dues aux erreurs possibles engendrées par les modèles, sont limitées en choisissant judicieusement les expériences X . La régression multilinéaire est programmée avec Modde 7 (Umetrics) et l'optimisation sur Matlab[®].

1.1.5. Optimisation multicritère par algorithme génético-évolucionnaire

A partir des résultats obtenus par planification expérimentale, un algorithme génético-évolucionnaire (Perrin *et al.*, 1997 ; Muniglia *et al.*, 2004) a été utilisé afin d'identifier les conditions d'extraction les plus performantes. Toutefois, pour déterminer les conditions les plus adaptées au regard du décisionnaire, nous avons appliqué une démarche issue du génie décisionnel, basée sur la théorie de « Rough-set » (Pawlak, 1998 ; Viennet *et al.* 1996) afin de répondre au mieux aux objectifs attendus.

➤ *Dénomination au sens de Pareto*

Pour notre problème multicritère, toutes les solutions obtenues sont représentées comme points dans un espace de recherche, appelé zone de Pareto. Parmi ces solutions aucune n'est meilleure par rapport aux autres sur l'ensemble des critères considérés simultanément. Il s'agit de l'ensemble des compromis acceptables (Trade-off) entre des objectifs pouvant être contradictoires. L'objectif de l'optimisation est d'identifier l'ensemble de ces compromis entre tous les critères. Par définition, une solution est optimisée au sens du Pareto si elle n'est dominée par aucune autre. Autrement dit, soient x et y deux points de l'espace, x domine y au sens de Pareto si « x » est un bon compromis pour tous les critères autant que y , mais strictement meilleur pour un d'eux par rapport à y . La dominance de tous les individus

(points) est ainsi évaluée pour tous les critères considérés. Le nombre de domination pour chaque critère est ensuite considéré. Seuls les individus non dominés sont conservés et classés. A la fin de cette démarche, la population non dominée obtenue représente l'ensemble des meilleurs compromis possibles.

Dans ce travail nous avons utilisé le génie décisionnel comme outil de choix de la condition optimale. Pendant cette phase, un jugement extérieur du décideur, connaissant le procédé à optimiser, est nécessaire pour favoriser l'un ou l'autre des critères. Suivant les objectifs attendus, le décideur établit des règles de préférence qui permettent de classer les compromis acceptables. Une telle approche, communément appelée théorie du « Rough-set » (Pawlak, 1998), est caractérisée par quatre étapes :

1. le décideur choisit, pour les trois critères retenus, cinq points faisant partie du front de Pareto (front des critères). Par la suite, trois groupes sont créés ; ils sont composés de cinq meilleurs compromis classés selon un ordre de préférence. Celui-ci est établi selon la priorité que le décideur donne à chaque critère ;
2. les règles de préférence et de non préférence sont hiérarchisées et appliquées à l'ensemble des solutions. La zone de Pareto issue de cette démarche et contenant les meilleures solutions acceptables à hauteur de 20 % est retenue ;
3. le barycentre de cette zone est identifié avec ses conditions opératoires associées ;
4. le décideur choisit alors une solution multicritère optimale.

Les résultats du modèle doivent alors être validés expérimentalement par la mise en œuvre des conditions optimales considérées.

1.2. Analyse de l'extrait de napines

1.2.1. Dosage des protéines par la méthode Kjeldhal

La concentration en protéine présente dans les extraits a été déterminée suite au dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl. La première étape de cette méthode est la minéralisation, pendant laquelle on dégrade la matière organique azotée sous la forme de sel d'ammonium. 2 mL d'échantillon, 2 mL d'acide sulfurique à 96 % (v/v), 1 mL de peroxyde d'hydrogène et 0,1 g de catalyseur sont mélangés dans un matras et chauffés à 400 °C

pendant 150 mn. Pour l'échantillon contrôle, l'extrait est substitué avec de l'eau osmosée. Cette dégradation se réalise à l'aide d'un minéralisateur de type « Kjeldhaltherm Digestion System » (Gerhardt, Brackley, GB). La deuxième étape est la distillation de l'ammonium en ammoniac, à l'aide d'une solution de soude à 36 % (p/v). La quantité d'ammoniac présente est ensuite dosée par titration avec une solution d'acide sulfurique 0,01 M et d'acide borique à 3 % (p/v). Pour chaque extrait, la quantité d'azote totale (MAT) a été calculée à l'aide de la formule suivante (Eq. E 18) :

$$[\text{MAT}]_{(\text{g/L})} = \left((V_s - V_b) M_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times M_N \right) / S \quad (\text{E 18})$$

où V_s et V_b sont les volumes (mL) d'acide sulfurique employés pour la titration respective de l'échantillon et du blanc respectivement ; $M_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ est la molarité de l'acide sulfurique (0,01 M), M_N représente la masse molaire de l'azote ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et S le volume d'échantillon utilisé (mL).

La quantité totale d'azote mesurée est composée d'une fraction protéique et d'une fraction non protéique représentée par des peptides. 5 mL d'extrait à analyser et 5 mL de TCA 40 % (v/v), sont centrifugés à 4.000 g après avoir été mélangés pendant 10 mn à température ambiante. Dans ces conditions les protéines précipitent et les molécules non protéiques restent en solution. L'azote présent dans le surnageant est ainsi dosé par la « méthode Kjeldahl ». La concentration réelle en protéine est représentée par la différence entre la fraction protéique totale et la fraction non protéique (Eq. E 19) :

$$[\text{MAP}]_{(\text{g/L})} = \left([\text{MAT}]_{(\text{g/L})} - 2[\text{MANP}]_{(\text{g/L})} \right) 5,7 \quad (\text{E 19})$$

où MAT est la matière azote totale ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), MANP est la matière azoté non protéique ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et 5,7 représente le taux de conversion azote/protéine desnapines d'après la séquence de Rico *et al.* (1996).

1.2.2. Electrophorèse sur Gel : SDS-PAGE

La taille moléculaire des protéines présentes dans les échantillons est déterminée par électrophorèse SDS-PAGE dans des conditions réductrices et non réductrices. L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées à travers un gel de polymère sous l'influence d'un champ électrique. Le SDS dissocie les protéines et les chaînes

peptidiques déployées résultantes ont des rapports charge/masse identiques. La distance de migration est alors uniquement fonction de la masse molaire. Le gel électrophorétique qui permet la séparation est un gel de polyacrylamide à 15 % (concentration souvent utilisée pour les protéines de taille comprise entre 10kDa et 100 kDa). La préparation du gel de migration correspond à un mélange de 5 mL d'acrylamide/bisacrylamide (30 : 0,8 %), 2,5 mL de Tris HCl 1,5 M pH 8,8, 200 µL de SDS 10 % (p/v), 2,3 mL d'eau osmosée, 50 µL d'APS 10 % (p/v) et 10 µL de NNN'N' – tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Un gel de concentration est ensuite préparé pour permettre aux échantillons de se positionner sur une même ligne dans le gel de migration. Pour ce gel, 1,3 mL d'acrylamide/bisacrylamide (30 : 0,8 %), 2,5 mL de Tris HCl 0,5 M pH 6,8, 100 µL de SDS 10 % (p/v), 6,3 mL d'eau osmosée, 50 µL d'APS 10 % (p/v) et 10 µL de TEMED sont mélangés. Les échantillons sont préparés à 2 g/L dans un tampon de dépôt contenant du Tris HCl 0,5 M pH 6,8, du SDS 10 %, du glycérol, eau et du bleu de bromophénol. Ce dernier est un colorant ionisé qui permet de suivre l'avancement de l'électrophorèse. Pour les analyses en condition réductrices, 3 % de β -mercaptoéthanol sont ajoutés au tampon de dépôt. Avant l'électrophorèse, les échantillons sont chauffés pendant 10 mn à 100 °C et 15 µL sont alors déposés dans les puits du gel. La migration est réalisée à une intensité de 10 mA pour le gel de concentration et à 20 mA pour le gel de migration avec un système BioRadAddis Mini Protean TGX (Marnes-la-Coquette, France). Le tampon d'électrophorèse est un mélange Tris HCl/glycine/SDS/eau (4/15/1/80). Le gel est coloré avec une solution colorante de Comassie R250 et décoloré avec une solution d'acide acétique/méthanol/eau (40/7/60).

1.2.3. Dosage des glucides par la méthode de Nelson-Somogyi

Il s'agit d'une méthode colorimétrique où les glucides réducteurs réduisent, en milieu basique, le cuivre cuivrique du réactif cuprique en oxyde cuivreux. 0,4 mL d'échantillon est mélangé avec le réactif cuprique (v/v) et incubé à 100 °C pendant 10 mn. L'oxyde cuivreux formé est traité avec 0,4 mL d'acide arsenomolybdique. La réduction de ce dernier conduit à la formation d'un composé vert-bleu qui est proportionnelle à la quantité initiale de glucides. Leur quantification est réalisée par lecture de leur absorbance à 520 nm avec un spectrophotomètre Cary 50 UV-Vis (Varian, Massy, France). L'absorbance des échantillons est comparée aux mesures d'absorbance d'une gamme étalon constituée de solutions de glucose.

1.2.4. Dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu

La fraction polyphénolique est extraite par hydrolyse acide et ensuite quantifiée par le réactif de Folin-Ciocalteu. Pour ce faire, 100 mL d'HCl 4 M et 10 mL d'éthanol sont adjoints à 0,5 g d'échantillon solide ou à 0,5 mL d'échantillon liquide. Le tout est placé au bain-marie à 90 °C pendant 2 h. Après hydrolyse, l'éthanol est évaporé dans un évaporateur sous vide. Les phénols sont alors extraits dans une ampoule à décanter avec un volume équivalent d'acétate d'éthyle (100 mL). Cette étape est répétée jusqu'à ce que la phase d'acétate d'éthyle devienne incolore. Celui-ci est ensuite évaporé sous vide et les polyphénols sont resolubilisés dans de l'eau osmosée (2,8 mL) supplémentée de propylène glycol (0,2 mL). Les phénols sont ensuite dosés. 1 mL d'échantillon mélangé avec du carbonate de sodium et du réactif de Folin-Ciocalteu (v/v) est incubé pendant 10 mn à 38 °C. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un composé coloré d'intensité proportionnelle à la quantité des phénols présents. L'absorbance de l'échantillon est alors lue à 660 nm et comparée à une courbe de calibration établie avec des solutions d'acide gallique de 5 à 30 g.L⁻¹.

1.3. Purification de l'extrait de napines

Les extraits obtenus sont purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Sephadex G-25, après précipitation au sulfate d'ammonium. La précipitation des protéines est due à l'effet dit de « salting-out » du sulfate d'ammonium sur les protéines.

1.3.1. La précipitation au sulfate d'ammonium

Une quantité appropriée de sulfate d'ammonium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier) est ajoutée à l'extrait afin d'obtenir une saturation finale de 65 %, soit 412 g.L⁻¹. Le tout est soumis à une faible agitation, à l'aide d'un barreau aimanté, pendant 30 mn à température ambiante. La solution est alors centrifugée à 9.000 x g pendant 30 mn à température ambiante. Le surnageant obtenu est écarté et le culot qui contient les protéines est stocké à 4 °C.

1.3.2. Chromatographie d'exclusion stérique sur colonne G-25

Le culot est remis en suspension dans un volume d'eau osmosée, approprié pour obtenir une concentration finale de protéine de $1,7 \text{ g.L}^{-1}$. La solution, filtrée sur membrane en acétate de cellulose $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, Molsheim, France), est déposée (12 % du volume de la colonne) et éluée avec de l'eau osmosée sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille ($1,6 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$) contenant un gel de Sephadex G-25 (GE Healthcare Life-Science, Orsay, France). L'éluution est réalisée à un débit de 4 mL.mn^{-1} avec un système de chromatographie basse pression AKTA (GE Healthcare Life-Science, Orsay, France). La détection des composés de l'extrait est réalisée en ligne à l'aide d'un détecteur U.V., à 280 nm et 325 nm, qui correspondent aux absorbances maximales respectives des napines/phénols et phénols isolés.

Après cette étape, les fractions des napines purifiées sont concentrées 4 fois à l'aide d'un extracteur rotatif sous vide partiel (R-144 Rotavapor[®], Buchi, E.U. d'Amérique) puis congelées à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ avant d'être lyophilisées (HetoDrywinner, Cambridge BioSystems, GB). La figure 19 montre les napines purifiées et lyophilisées après extraction selon les 29 conditions opératoires du plan expérimental.

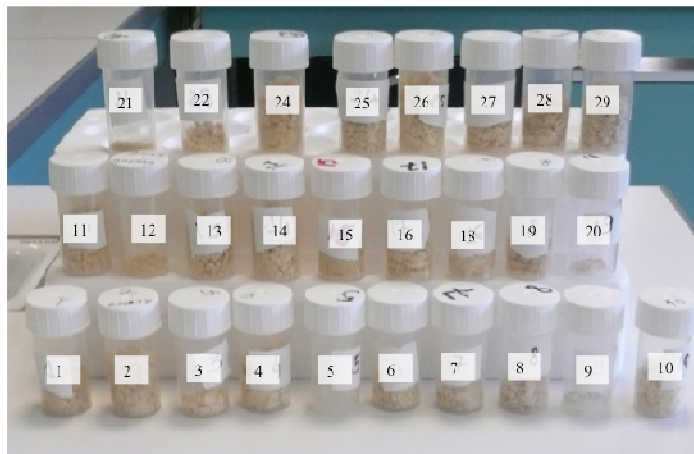


Figure 19. Napines purifiées et lyophilisées obtenues après extraction selon les 29 conditions du plan expérimental.

1.3.3. Purification de l'extrait des napines à l'échelle pilote

L'exigence de produire une grande quantité des napines (50 g) pour la suite des travaux engagés au cours de cette thèse a nécessité la mise en œuvre d'un procédé de purification à grande échelle. L'étape, très coûteuse, de précipitation au sulfate d'ammonium a été substituée par un procédé de séparation membranaire.

Tout d'abord les extraits obtenus sont clarifiés. La clarification d'un volume plus important d'extrait est effectuée par une filtration tangentielle (microfiltration). La clarification est réalisée grâce à un système de filtration ProScale (Millipore, Bedford, E.U. d'Amérique), avec une membrane 0,22 μm et une surface de filtration de 0,1 m^2 . Les expériences sont effectuées à une pression de 0,16 bar. Les mesures du débit tout au long du procédé ont permis d'évaluer le phénomène du colmatage. La membrane est nettoyée avec de l'eau et une solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 0,5 % (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier) et conservée dans une solution contenant de l'azoture de sodium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier) à 0,05 % et à 4 °C.

L'extrait clarifié est ensuite concentré et purifié par ultrafiltration et diafiltration dans le même système de filtration. Au cours de l'étape d'ultrafiltration, 5 L d'extrait sont concentrés à un facteur de concentration volumique de 5 (FCV 5), valeur maximale réalisable selon les performances de l'appareil. Chaque filtration est réalisée avec une membrane de 0,1 m^2 de surface (Pellicon 2, Biomax, Millipore, Molsheim, France), un seuil de coupure de 3 kDa, à température ambiante et à 3 bar. Les protéines d'intérêt (14 kDa) sont donc retenues dans le rétentat et les molécules contaminantes dans le perméat (Figure 20).

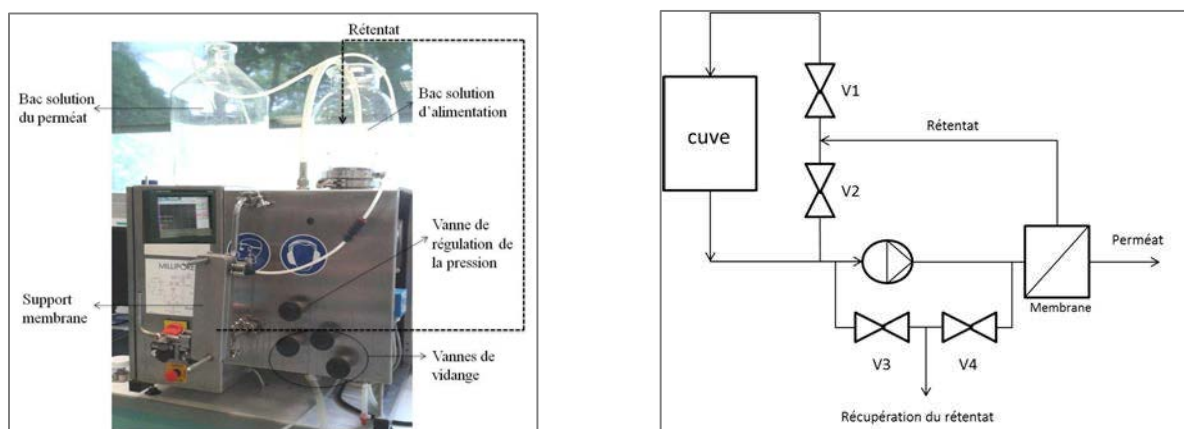


Figure 20. Photographie du pilote d'ultrafiltration du laboratoire (à gauche). Schéma de l'installation (à droite).

L'étape de concentration est suivie d'une étape de diafiltration. La diafiltration est effectuée en ajoutant, au rétentat, le même volume d'eau acidifiée à pH 2 avec du HCl 2 N (Carlo Erba, Val de Reuil, France). Le rétentat ainsi obtenu est purifié par chromatographie d'exclusion stérique selon le protocole précédemment décrit. Tout au long du procédé, des mesures du débit sont effectuées afin d'étudier le phénomène de colmatage de la membrane. Le nettoyage de la membrane est effectué avec de l'eau et de la soude 0,1 N (Merck, Guyancourt, France) afin d'éliminer toute molécule protéique résiduelle dans le système et dans les volumes morts. Le cycle de rinçage (eau-soude) est effectué jusqu'à la reprise du débit initial en eau. La membrane est conservée dans une solution de soude 0,1 N, à 4 °C.

La solution de napines ainsi obtenue est filtrée avec un double filtre de 0,4-0,2 µm (Sartopore 2 Mini Cartridge, Aubagne, France). Ensuite, 867 mL d'extrait sont injectés et élués avec de l'eau osmosée sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (10 × 11 cm) contenant un gel de Sephadex G-25. L'élution est réalisée à un débit de 40 mL.mn⁻¹ avec un système de chromatographie basse pression AKTA (GE Healthcare Life-Science, Orsay, France). Comme mentionné auparavant, le suivi est réalisé à 280 nm et 325 nm.

1.3.4. Chromatographie liquide haute performance sur colonne de phase inverse C4

Cette technique permet d'estimer qualitativement la contamination par les polyphénols des extraits et de l'isolat de napines obtenus pendant les différentes étapes du procédé d'extraction/purification.

10 µL de napines (15 g.L⁻¹), filtrés sur filtre seringue 0,22 µm (Minisart, Millipore, Molsheim, France), sont injectés sur un système CLHP Shimadzu équipé d'une colonne C₄ (250 mm × 2,1 mm) Prosphere300 Å (Alltech, Deerfield, IL, E.U. d'Amérique) et un détecteur UV. Les analyses sont réalisées à 35 °C, à un débit de 0,2 mL.mn⁻¹ avec un gradient constant (Figure 21) de 80 mn de 0 % à 100 % d'un mélange d'eau/ acétonitrile/acide trifluoroacétique (5/95/0,5) (v/v/v) (ACN : Carlo Erba; TFA : Sigma-Aldrich).

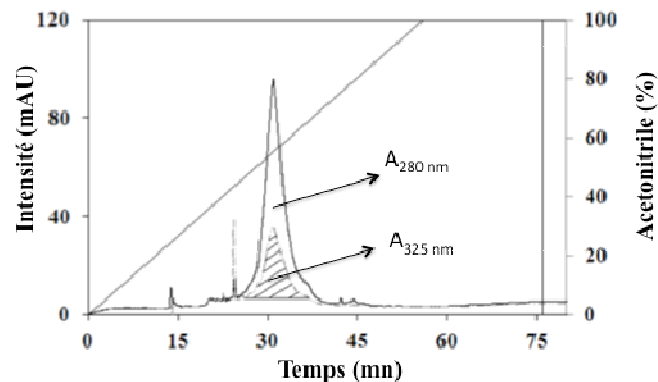


Figure 21. Profil de CLHP-ES des napines purifiées. Les surfaces des signaux à 280 nm (A_{280}) et 325 nm (A_{325}) sont intégrées afin de quantifier l'association polyphénols/napines.

Afin d'éliminer les molécules adsorbées sur la matrice de la colonne, cette dernière est rincée pendant 10 mn avec de l'ACN pur. La détection des napines et des polyphénols est réalisée à 280 et 325 nm, respectivement. L'association protéines/polyphénols est évaluée selon le rapport de l'intégration du signal à 280 nm (A_{280}) sur celui à 325 nm (A_{325}) (Figure 23).

2. ANALYSE STRUCTURALE DES NAPINES EXTRAITES

Après purification la structure des napines est évaluée par différentes techniques. Leur séquence est aussi déterminée.

2.1. Séquençage N-terminal

Le séquençage N-terminal d'une protéine consiste à réaliser une dégradation récurrente à partir de l'extrémité N-terminale (chimie d'Edman).

Le séquençage des napines est réalisé par le Service Commun de Séquences des Protéines (SCSP) de la Faculté de Sciences et Techniques de Nancy (Université de Lorraine). Le SCSP dispose de deux séquenceurs automatiques Applied Biosystems : Procise 492A et 473 A (E.U. d'Amérique).

2.2. Détermination de la structure secondaire et tertiaire de napines

La structure secondaire des napines est analysée par dichroïsme circulaire (DC) dans l'UV lointain. Le repliement tertiaire est évalué par dichroïsme circulaire dans le proche UV et par fluorescence.

2.3. Etude de la structure de napines par dichroïsme circulaire (DC)

Pour les protéines, la mesure du dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (190-260 nm) permet de déterminer leur contenu en structure secondaire (en pourcentage), alors que les signaux dans l'UV proche (250-330 nm) fournissent des informations sur leur repliement tertiaire. Les analyses structurales en DC sont réalisées au Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires (SCBIM) de la Faculté de Sciences et Technologies de Nancy (U.L.). Le SCBIM dispose d'un appareil de dichroïsme circulaire de type CD6 Jobin-Yvon (Longjumeau, France).

- Dichroïsme Circulaire dans le lointain UV (DC-L.UV)

2 mL de protéines solubilisées dans un tampon phosphate 20 mM à pH 7, à raison de 0,15 mg.mL⁻¹ sont placés dans une cuve en quartz de parcours optique de 1 mm. Le balayage des longueurs d'ondes UV s'étend de 190 nm à 250 nm. L'analyse est réalisée à 25 °C. Le pourcentage de structure secondaire est déterminé par utilisation d'un logiciel « DICROPROT » (Deléage et Geourjon, 1993).

- Dichroïsme Circulaire dans le proche UV (DC-P.UV)

2 mL de protéines solubilisées dans un tampon phosphate 20 mM à pH 7, à 25 °C et à une concentration de 1,5 mg.mL⁻¹ sont placés dans une cuve en quartz de parcours optique de 10 mm. Le balayage des longueurs d'ondes UV va de 190 nm à 250 nm.

Chaque analyse en DC L.UV et P.UV est réalisée en triplica. Des essais avec le tampon seul sont réalisés puis soustraits aux spectres des échantillons.

2.4. Etude de la structure tertiaire de napines par fluorescence

La fluorescence est une technique basée sur la fluorescence intrinsèque des résidus de tryptophane (Trp), inclus dans la protéine. La fluorescence émise est directement liée à son environnement. Elle se déplace vers le rouge si l'environnement de ce résidu est polaire ou vers le bleu si l'environnement est hydrophobe. Les napines sont constituées de deux résidus de Trp. Les modifications structurales des napines exposent de façon différente ces résidus, ce qui induit une variation de la λ_{\max} .

Dans cette étude, les mesures de fluorescence sont effectuées avec un spectrofluorimètre Fluorolog-3 (Jobin Yvon-Spex Instruments S.A. Inc., Longjumeau, France) équipé d'une cellule thermostatée et d'une lampe au xénon 450 W. Pour les analyses, 3 mL de napines solubilisées à une concentration de 0,4 g.L⁻¹ dans un tampon sont déposés dans une cuve en quartz. La longueur d'onde d'excitation du Trp est de 280 nm, l'intensité d'émission est observée entre 320 et 450 nm.

- Dénaturation chimique des napines

L'effet de la dénaturation chimique est étudié par incubation des napines avec différentes concentrations de Chlorure de Guanidinium (Gdn,HCl) allant de 0 à 8 M et à différents pH. Les différents essais ont permis de déterminer les variations de λ_{\max} en fonction de la concentration en Gdn,HCl à pH 2, 3,7, 9 et 11. Ainsi, pour chaque pH, une λ_{\max} est définie pour 100 % de dénaturation, obtenus avec une solution 8 M de Gdn,HCl et en absence de dénaturation (pas d'agent dénaturant) (Figure 22).

Les valeurs de λ_{\max} obtenue au cours de cette étude ont été ensuite utilisées pour évaluer le taux de dénaturation des napines (F_d), dans les conditions de pH spécifiques, selon la formule suivante (Eq. E 20) :

$$F_d = (\lambda_n - \lambda) \div (\lambda_n - \lambda_d) \quad (\text{E } 20)$$

où, pour chaque pH, λ_n correspond à la λ_{\max} des napines en absence d'agent dénaturant, λ est la λ_{\max} des napines à une concentration donnée en Gdn,HCl et enfin λ_d représente la λ_{\max} en présence d'une solution 8 M de Gdn,HCl.

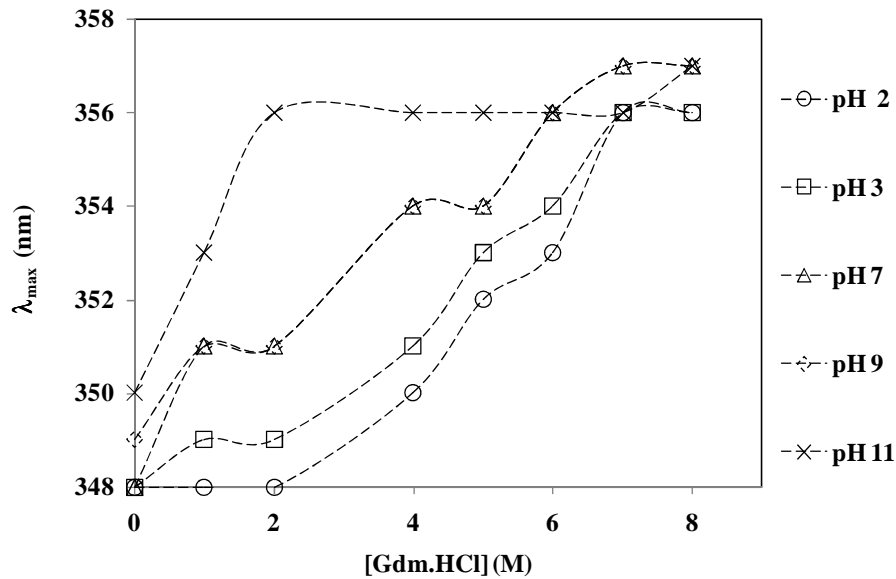


Figure 22. Evolution de la fluorescence (λ_{\max}) des napines en fonction de la concentration en Gdm.HCl. Conditions expérimentales : 25 °C, concentration en napines de 0.4 g.L⁻¹, pH = 2, 3, 7, 9 et 11. Les courbes sont la moyenne de trois expériences.

- Cinétique de dénaturation thermique de napines

L'influence de la température, à différents pH (2, 3, 7, 9 et 11), est étudiée par soumission des échantillons à un traitement thermique (25 °C, 50 °C et 75 °C). Une cinétique est suivie pour chaque température. Les mesures sont effectuées chaque 5 mn, pendant une demi-heure, à un couple de pH / température. Ces expériences ont permis de déterminer les variations de λ_{\max} en fonction du temps pour différents conditions opératoires. A partir de ces résultats, en appliquant la formule précédente (E 20), il a été possible de déterminer le taux de dénaturation des napines en fonction du pH et de la température, pour chaque expérience.

2.5. Etude de la température de dénaturation des napines par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage est employée pour l'étude de la stabilité thermique des protéines. En mesurant la variation de la capacité calorifique (ΔC_p) en fonction de la température (balayage de 20 °C à 130 °C), la DSC permet de déterminer les variations

d'entropie (ΔS) et d'enthalpie (ΔH), ainsi que la température de demi-transition spécifique à chaque transition structurale.

Un microcalorimètre à balayage est constitué de deux chambres égales : l'une contient l'échantillon de référence (Cr) dont on connaît la chaleur spécifique et l'autre, l'échantillon d'étude (Ce) (Figure 23). L'appareil chauffe à une vitesse constante les compartiments. Il mesure ensuite la quantité d'énergie fournie pour maintenir la même température dans les deux compartiments. La différence de chaleur émise entre les deux cellules dépend de la différence de chaleur spécifique entre Ce et Cr et des effets thermiques dus aux transitions structurales.

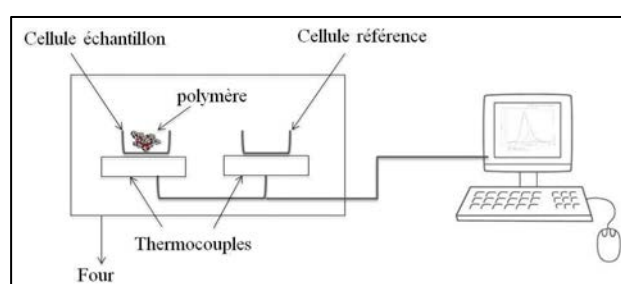


Figure 23. Schéma d'un appareil DSC.

Les analyses en DSC sont réalisées au Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires (SCBIM) qui dispose d'un microcalorimètre VP-DSC (MicroCal-SETARAM, Caluire, France). Le tampon de référence (tampon phosphate 20 mM) est soumis à plusieurs analyse DSC afin d'obtenir une ligne de base reproductible. Après cette étape, l'analyse de l'échantillon est engagée. Après dégazage, 500 μL de protéines (solubilisées dans le tampon phosphate 20 mM, pH 7) à 7g.L⁻¹ sont déposés dans le compartiment (Ce) du microcalorimètre. L'échantillon est balayé dans une rampe constante de température comprise entre 20 °C et 130 °C à une vitesse de 1 °C.mn⁻¹. La solution de protéines est alors refroidie à 20 °C puis un deuxième balayage est appliqué afin d'évaluer la réversibilité de la réaction. Le thermogramme obtenu est analysé à l'aide du logiciel du microcalorimètre ORIGIN[®] (Microcal, Northampton, MA, E.U.) qui propose un modèle capable de représenter les données expérimentales. L'équation E 21 correspond à un model « non two state » (Eq. E 21):

$$C_p = \frac{K_{a1} \Delta H_{vH1} \Delta H_1}{(1 + K_{a1}) RT^2} + \frac{K_{b2} \Delta H_{vH2} \Delta H_2}{(1 + K_{b2}) RT^2} \quad (\text{E } 21)$$

avec,

$$K_{a1} = e^{\left(-\frac{\Delta H_{vh1}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_{m1}}\right)\right)} \text{ et } K_{b2} = e^{\left(-\frac{\Delta H_{vh2}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_{m2}}\right)\right)} \quad (\text{E 22-E 23})$$

où C_p est la capacité calorifique ($\text{cal.}^\circ\text{C}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), $\Delta H_{vH1,2}$ sont les enthalpies de Van'tHoff des transitions 1 et 2 (cal.mol^{-1}), $\Delta H_{l,2}$ sont les enthalpies des transitions 1 et 2 (cal.mol^{-1}), $T_{m1,2}$ sont les températures de capacité calorifique maximale (température de transition) des deux transitions ($^\circ\text{C}$) et R est la constante des gaz parfaits ($\text{cal.}^\circ\text{C}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).

- Effet du pH

Des analyses des napines, solubilisées dans des tampons à différents pH, sont réalisées afin d'évaluer l'effet du pH sur leur température de dénaturation. Pour les expériences, nous avons utilisé un tampon citrate à pH 2 et un tampon borate à pH 11. Les conditions opératoires appliquées sont identiques à celles mentionnées précédemment.

3. PROTEOLYSE ENZYMATIQUE

3.1. Le substrat protéique

L'isolat de napines obtenu à partir du procédé d'extraction et de purification à l'échelle pilote décrit dans le paragraphe précédent est utilisé comme substrat pour le procédé d'hydrolyse enzymatique.

3.2. Les protéases sélectionnées

Pour cette étude, deux protéases différentes ont été choisies : une à large spectre d'action, l'Alcalase[®] 2,4 L, et une à spécificité étroite, la pepsine. Ces deux enzymes ont une activité optimale d'hydrolyse à des conditions de pH déférents : basique pour l'Alcalase[®] 2,4 L et acide pour la pepsine. Ces conditions correspondent à différents états structuraux du substrat, ce qui justifie le choix de ces deux enzymes.

3.2.1. L'Alcalase® 2,4 L

L'Alcalase® 2,4 L (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) est une préparation enzymatique protéolytique produite par une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis*. Le constituant principal de cette protéase est la subtilisine A (Subtilisine Carlsberg). C'est une endoprotéase à sérine, de faible spécificité (EC : 3.4.21.14). Dans les formulations liquides, elle a une densité de 1,18 g.mL⁻¹ et présente une activité protéolytique de $1,7 \times 10^5$ UA.ml⁻¹ (Unité Anson.mL⁻¹). Son activité optimale se situe à un pH compris entre 6,5 et 9 et une température comprise entre 55 °C et 80 °C. Elle est inactivée suite à incubation à 90 °C pendant 15 mn.

3.2.2. La pepsine

La pepsine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) est la principale enzyme du suc gastrique porcine. C'est une endoprotéase appartenant au groupe des aspartyl-protéases (EC : 3.4.23.1) et a une haute spécificité pour les résidus hydrophobes et aromatiques. L'activité de la pepsine, mesurée par la méthode Anson, est de 400 UA.mg⁻¹. Son activité optimale est aux faibles valeurs de pH (entre 1,8 et 4) et est stable à 60 °C. La pepsine est inactivée irréversiblement à pH basique (8-8,5).

3.3. Evaluation de l'activité protéolytique par la méthode Anson

L'activité protéolytique de ces deux enzymes a été mesurée par la méthode d'Anson modifiée. Dans cette méthode l'hémoglobine dénaturée est hydrolysée en conditions standard (10 mn, pH 7,5 et 40 °C) et l'hémoglobine non hydrolysée est précipitée par l'action du TCA 0,3 N (acide tri-chloro acétique). La quantité de matière azotée non protéique soluble dans le TCA est évaluée par le réactif de Folin-Ciocalteu, qui, en réagissant avec la tyrosine, le tryptophane, la cystéine et l'histidine conduit à une couleur bleue de la solution étudiée.

Dans un premier temps, une solution d'hémoglobine dénaturée est préparée. Pour cela 6,35 g d'hémoglobine sont solubilisés dans une solution d'urée (115 g), de NaOH (24 g), de KH₂PO₄ (56 g) et d'eau (qsp 326 g) à pH 7,5 (ajusté avec HCl 1 N). Le tout est traité thermiquement à 40 °C pendant 40 mn.

Dans chacun des deux tubes (échantillon et référence) sont versés 500 mL de protéase diluée, à une concentration de 10 %, dans un tampon phosphate 0,1 M. 2,5 mL de TCA 0,3 M sont uniquement ajoutés dans le tube de référence. Ensuite, 1 mL d'hémoglobine dénaturée est déposé dans les deux tubes. Après avoir incubé les deux tubes pendant 10 mn à 40 °C, 2,5 mL de TCA sont alors ajoutés dans le tube d'échantillon. Les deux tubes, agités au vortex, sont incubés à température ambiante pendant 30 mn. Le contenu des deux tubes, après agitation, est filtré sur un filtre seringue 0,22 µm (millipore). 1,5 mL du filtrat est mélangé avec 2,8 mL de NaOH (0,5 N) (Merck, Semoy, France). Cette dernière solution est incubée pendant 8 mn à température ambiante avec 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier), dilué au ½ avec de l'eau osmosée. L'absorbance est mesurée à 750 nm.

Une unité Anson (UA) représente la quantité d'enzyme (en g pour les préparations solides ou en mL pour les liquides) nécessaire pour avoir une absorbance de 0,1. Le nombre d'UA.g⁻¹ ou UA.ml⁻¹ peut alors être déterminé.

3.4. Mise en œuvre de la protéolyse

L'hydrolyse enzymatique des napines est réalisée selon la technique du pH-Stat (Adler-Nissen, 1986). Le principe de cette méthode consiste à maintenir constant le pH par titration automatique des protons libérés au cours de la protéolyse en ajoutant un acide ou une base. Pour la réalisation des expériences, nous avons utilisé un système de type 736 GP Titrino (Metrohm, Villebon-sur-Yvette, France) couplé à un bain thermostaté Polystat 11-33197 (BioblockScientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Le Titrino est connecté à un logiciel (Tiamo, Metrohm, Villebon-sur-Yvette, France) qui permet de contrôler les paramètres pH et température. La régulation du pH est effectuée avec des solutions de soude 1 N (Merck, Semoy, France) et HCl 0,1 N (Carlo Erba, Val de Rueil, France). L'incrément de la burette est de 2 µL. Le mélange réactionnel est agité grâce à un barreau aimanté. Le schéma du dispositif expérimental est fourni dans la figure 24.

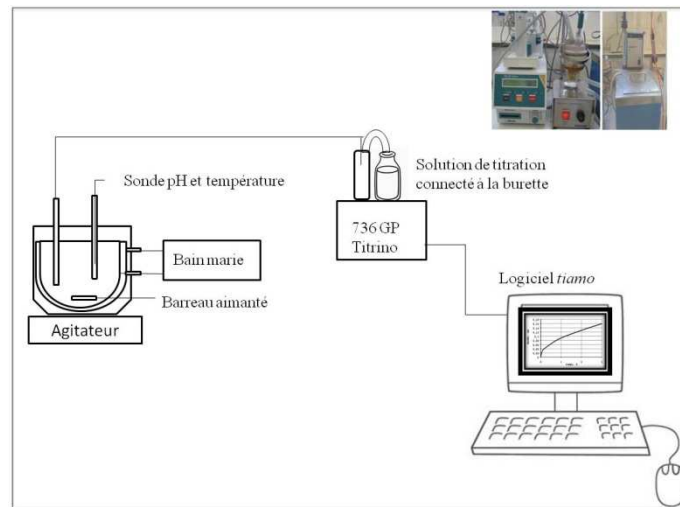


Figure 24. A) Schéma du système d'hydrolyse. B) Photographie de l'appareil du laboratoire.

- Préparation du substrat et de l'enzyme

A partir des résultats concernant l'état de dénaturation des napines, nous avons choisi différentes conditions opératoires d'hydrolyse. Le tableau 3 présente les différentes conditions expérimentales utilisées pour chacune des enzymes.

Tableau 3. Différentes conditions d'hydrolyse expérimentées avec l'Alcalase® 2,4L et la pepsine.

Réaction de protéolyse			
Enzyme	pH	T°C	durée de réaction (h)
Alcalase® 2,4 L	9	25 °C	3 h
		50 °C	
		75 °C	
Pepsine	2	25 °C	1 h
		50 °C	
		75 °C	

Afin d'évaluer l'impact de l'état structural sur la cinétique de protéolyse, chaque réaction est réalisée sur un substrat ayant subi ou non, une incubation préalable de 30 mn, autrement dénommée chambrage dans les conditions opératoires d'hydrolyse.

Les expériences sont réalisées dans un volume final de milieu réactionnel de 50 mL. La concentration en substrat est de 10 g.L⁻¹. Les hydrolyses en milieu basique (pH 9) sont obtenues avec une concentration en Alcalase[®] 2,4 L de 0,5 mL.L⁻¹, ce qui correspond à 6,8 × 10³ UA.g⁻¹ de substrat. Les hydrolyses avec la pepsine sont effectuées à un ratio enzyme/substrat de 1/100, correspondant à 1000 UA pour 50 mL de milieu réactionnel. Une solution préalable de pepsine concentrée est préparée avec une solution d'acide chlorhydrique à 10 mM.

Les napines sont solubilisées dans de l'eau osmosée aux pH et température de la réaction. Pour les hydrolyses avec l'Alcalase[®], le pH de l'eau est ajusté à 9 avec de la soude 2 N. Dans les cas d'hydrolyses avec la pepsine, le pH de l'eau est ajusté à 2 avec du HCl 0,1 N. La durée des hydrolyses est de 3h pour l'Alcalase[®] 2,4 L et de 1 h pour la pepsine. Les cinétiques d'hydrolyse sont enregistrées toutes le 60 s. La réaction enzymatique de l'Alcalase[®] 2,4 L est arrêtée par traitement thermique : les hydrolysats sont chauffés dans un bain-marie (Dry Bath System, Starlab, Bagneux) pendant 15 mn à 90 °C. L'activité de la pepsine est stoppée par ajustement du pH à 9 avec quelques µL de soude 2 N. Les échantillons d'hydrolysat sont analysés par CLHP-PI immédiatement ou congelés à -20 °C.

- Détermination du degré d'hydrolyse

Au cours de l'hydrolyse enzymatique, il y a une libération de protons (à pH alcalin) ou d'électrons (à pH acide) qui induisent une variation du pH du milieu réactionnel. Dans la méthode du pH-Stat, le maintien du pH constant par titration automatique, par ajout d'une base ou d'un acide, est proportionnel au nombre des liaisons clivées (Adler-Nissen, 1986). Le facteur de proportionnalité est le degré de dissociation des groupes α-aminés. Ce facteur est calculé selon l'équation suivante (Eq. E 23):

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (\text{E 23})$$

A pH et température constants, la valeur moyenne de pK est considérée constante. Dans ce travail, nous avons calculé le pK selon la formule suivante (Eq. E 24) :

$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T)}{(298 \times T)} \times 2400 \quad (\text{E 24})$$

Pour pH = pK, α a une valeur de 0,5, tandis qu'à pH élevé, α tend vers 1 et à pH faible, α se situe vers 0.

A partir de ces deux formules, il est possible de déterminer le degré d'hydrolyse (DH en %) de la protéine. Comme mentionné dans la partie bibliographique, si le pH réactionnel est au-dessus du pKa des groupes α -aminés alors (Eq. E 25) :

$$DH(\%) = \frac{B \times N_b}{\alpha \times Mp \times h_{tot}} \times 100 \quad (\text{E 25})$$

où B est la consommation de base (mL), N_b la normalité de la base (N), α le degré moyen de dissociation des groupes α -aminés et M_p la masse de la protéine (g).

Si le pH est en dessous du pKa des groupes α -aminés, l'équation devient (E 26) :

$$DH(\%) = \frac{A \times N_a}{(1 - \alpha) \times Mp \times h_{tot}} \times 100 \quad (\text{E 26})$$

où A est la consommation d'acide (mL), N_a la normalité de l'acide (Randriamahatody *et al.*, 2011).

Pour cette étude, une valeur de $h_{tot} = 7,6$ a été utilisée, après calcul obtenu à partir de la séquence des napines (Rico *et al.*, 1996).

Nous avons aussi déterminé la vitesse initiale de la réaction (V_0). En considérant que V_0 est constante lors des premières 5 mn d'hydrolyse, sa valeur a été calculée de la manière suivante (Eq. E 27) :

$$V_0 = \frac{DH_{5mn} \times S_0 \times h_{tot} \times 60}{100 \times 5} \quad (\text{E 27})$$

où V_0 est la Vitesse initiale (nombre des liaisons clivées par unité de temps), DH_{5mn} , le degré d'hydrolyse à 5 mn (%) et S_0 , la concentration en substrat (g.L^{-1}).

3.5. Séparation des mélanges peptidiques par chromatographie haute performance en phase inversée (CLHP-PI)

Afin de comparer les propriétés physico-chimiques des mélanges peptidiques issus des conditions opératoires d'hydrolyse variées, les hydrolysats sont analysés par CLHP-PI.

10 μL d'hydrolysats à 10 g.L^{-1} , filtrés avec un filtre seringue $0,22 \mu\text{m}$, sont injectés dans un système CLHP Shimadzu équipé d'une colonne C_4 ($250 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$) Prosphere300 Å (Alltech, Derfield, IL, E.U. d'Amérique) et un détecteur UV. Les analyses sont réalisées à 35°C , à un débit de $0,2 \text{ mL.mn}^{-1}$. L'élution est réalisée avec deux gradients d'une durée totale de 70 mn. Le profil appliqué pour cette analyse est décrit dans le tableau 4.

Tableau 4. Profil appliqué pour l'analyse des mélanges peptidiques en CLHP-PI (C_4).

Etape	temps (mn)	% B	Débit (mL.mn^{-1})
1	0	0	0,5
2	40	30	0,5
3	60	100	0,5
4	70	100	0,5
5	0	0	0

4. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES DE NAPINES ET DES HYDROLYSATS OBTENUS

4.1. Propriétés biologiques

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'analyse des effets biologiques des napines et de ses hydrolysats issus de différentes réactions de protéolyse par l'Alcalase[®] 2,4 L. Les propriétés biologiques ciblées sont les propriétés antimicrobiennes et la stimulation de la croissance des cellules animales cultivées en milieu sans sérum. Ces activités sont étudiées par intégration du substrat protéique ou d'un hydrolysats dans les milieux de culture.

L'activité antifongique des napines non hydrolysées est observée sur des cultures de *Fusarium langsethiae*, champignon filamenteux producteur de mycotoxines impliquées dans la contamination des céréales.

L'activité antimicrobienne des napines et des hydrolysats est estimée à partir de l'inhibition de la croissance du microorganisme. La souche cible choisie pour cette étude est une bactérie de type Gram + : *Bacillus coagulans*. Cette bactérie, acidophile et thermorésistante, de par sa capacité de produire de l'acide lactique sans formation de gaz, peut provoquer une fermentation des aliments en conserve (« flat-sour »). Les spores de *B. coagulans* sont capables de germer et de se développer dans des conditions de faible pH (pH 4). C'est la raison pour laquelle, on les retrouve souvent dans les légumes et les produits issus de la tomate, placés dans des boîtes de conserve.

4.1.1. Test antifongique sur *Fusarium langsethiae*

10 mL de solution de napines sont solubilisés à une concentration de 60 g.L⁻¹ dans du tampon phosphate 20 mM, à pH 7 puis filtrés avec un filtre seringue 0,22 µm (Millipore, Molsheim, France). A partir de cette solution, une gamme de dilution allant de 1 à 1/8 est préparée. Quatre concentrations sont alors obtenues : de 7,5 g.L⁻¹ à 60 g.L⁻¹.

11 mL de milieu nutritif gélosé (Yeast Malt, YM) (Difco Microbiology, Lawrence, E.U. d'Amérique) contenant 1 mL de napines à différentes concentrations sont déposés dans chaque boîte de Pétri (⊙ = 100 mm). La concentration finale des napines dans les boîtes est donc de 0,6, 1,25, 2,5 et 5 g.L⁻¹. A l'aide d'une anse, une quantité de pathogène *Fusarium langsethiae* (souche isolée issue d'orge récoltée en 2008) est alors placée au milieu de chaque boîte de Pétri. Les cultures sont incubées pendant 5 jours à 25 °C, avec une alternance de périodes de lumière et d'obscurité de 12 h. Chaque jour, des mesures de diamètre majeur (⊙ max) et mineur (⊙ min) de la colonie sont effectuées. Chaque expérience est réalisée trois fois. La concentration inhibant 50 % de la croissance microbienne (CI₅₀) est déterminée à partir des mesures ⊙ max et ⊙ min des colonies en présence et absence de napines.

4.1.2. Test antimicrobien sur *Bacillus coagulans*

Pour ce travail, nous avons utilisé une souche de *B. coagulans* provenant du laboratoire de microbiologie alimentaire de l'E.N.S.A.I.A. (U.L., Nancy).

La souche est cultivée dans un milieu de culture liquide de TSB (Trypcase-SoyBroth) (BioMérieux, Craponne, France) supplémenté de 0,6 % d'extrait de levure (YeastExtract)

(Biokar Diagnostic, Beauvais, France). Après 16 h d'incubation à 37 °C, la densité optique (DO) de la solution de culture est mesurée à 660 nm.

Un milieu BN (Bouillon Nutritif) (BioMérieux, Craponne, France) gélosé à 1,2 % est alors préparé pour les tests antimicrobiens. Ce milieu estensemencé avec une quantité de micro-organismes appropriée pour obtenir une $DO_{660\text{ nm}}$ de 0,01.

12 mL de milieu BNensemencé sont déposés dans une boîte de Pétri ($\varnothing = 100\text{ mm}$) puis incubés pendant 30 mn à 4 °C pour refroidir la gélose. 20 μL d'échantillon (napines ou son hydrolysat) sont alors déposés dans des puits préalablement creusés dans la gélose avec une cloche de Durham ($\varnothing = 5\text{ mm}$) stérile. Les boîtes sont incubées pendant 16 h à 4 °C puis à 37 °C pendant 72 h. La croissance est observée chaque jour. La présence d'une activité antimicrobienne se traduit par l'apparition d'une zone de non croissance autour du puits.

4.1.3. Impact de napines et de leurs hydrolysats sur la croissance des cellules animales

L'effet denapines et des différents hydrolysats de napines, issus de l'hydrolyse avec l'Alcalase[®] 2,4 L, sur la croissance des cellules animales, est étudié. L'influence de ces produits, comme additifs ou substituts dans les milieux de culture de cellules animales, est évalué sur la croissance de cellules de type CHO-AMW (cellules d'Ovaire d'Hamster Chinois) (EPFL, Lausanne, Suisse). Cette lignée cellulaire est productrice d'anticorps humain IgG1 anti-rhésus D (anti-RhD).

➤ Ensemencement des cellules CHO-AMW

Les CHO sont cultivées dans un milieu de référence, le ProCHO5, supplémenté par 5 mM de glutamine. Ce milieu estensemencé à une concentration de $3,5 \times 10^5\text{ cellules.mL}^{-1}$ en fioles d'Erlenmeyer (Corning[®] Fontenay sous Bois, France), placées sur une table d'agitation (IKA) (110 tr.mn^{-1}) et incubées dans une étuve régulée à 37 °C pendant 48 h. Les cellules ainsi cultivées sont ensuite adaptées aux milieux de culture BDM (Basal Defined Medium) puis BDM /RPMI (Eurobio, Coutabeuf, France) dans une proportion 1 : 9 (v/v),ensemencées à une concentration de $0,4 \times 10^5\text{ cellules.mL}^{-1}$. Ces cellules sont utilisées pour les études de croissance en présence de suppléments (napines et hydrolysats de napines).

➤ Essais de croissance des CHO-AMW

Les essais sont réalisés en plaque de 96 puits (Corning) dans un volume total de 200 μL . 20 μL de napines ou d'hydrolysats de napines sont dissous dans du PBS (Phosphate Buffer Solution) afin d'obtenir une concentration finale de 0,2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et de 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les solutions sont ensuite filtrées sur filtre seringue 0,22 μm . 180 μL de culture dans le milieu BDM/RPMI (10/90) sont ajoutés dans chaque puits. Dans la condition de référence, le milieu est dilué avec 20 μL de PBS. Chaque condition de culture est répétée 6 fois. Nous avons étudié 10 conditions de cultures différentes par plaque : 3 conditions témoin, 1 culture avec les napines et 7 cultures avec 7 mélanges issus de différentes conditions d'hydrolyse des napines. Les microplaques des cultures sont incubées dans une étuve à 37 °C (Sanyo, Singapour). La croissance cellulaire est suivie deux fois par jour, pendant 120 h, par un système de comptage de type Cellscreen[®] (Innovatis, AG, Bielefeld, Allemagne). Le Cellscreen[®] est un système non invasif, composé d'un objectif $\times 4$ ou $\times 10$, d'un système de photographie numérique et d'un analyseur d'images. Ce système permet de suivre l'évolution de la concentration des cellules ainsi que leur morphologie.

Le comptage au Cellscreen[®] est précédé par une remise en suspension des cellules, afin de dissocier d'éventuels agrégats, puis par une étape de sédimentation de 30 mn.

4.2. Propriétés fonctionnelles des napines et de leurs hydrolysats

Les propriétés fonctionnelles des napines et de leurs hydrolysats par la pepsine, ciblées dans cette étude, sont leur capacité à former de la mousse et des émulsions. Les méthodes utilisées pour déterminer ces propriétés sont reprise de Vioque *et al.* (2000).

Pour cette étude, on a choisi, comme substrat, les mélanges peptidiques des napines issus d'hydrolyses avec la pepsine. Pour évaluer l'impact du procédé d'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles, les propriétés moussantes et émulsifiantes des napines entières sont comparées à celles des hydrolysats.

4.2.1. Propriétés moussantes et stabilité des mousses

5 mL de napines ou d'hydrolysats de napines à 10 % (p/v) sont placés dans un flacon gradué puis homogénéisés (Ultraturax T25 Janke&Kunkel, Labortechnik, Staufen, Allemagne) à 8000 tr/mn pendant 5 mn. La capacité moussante est déterminée comme étant le rapport entre le volume de mousse (mL) et le volume total du mélange (mL). Il est exprimé en

pourcentage. Le pourcentage de mousse restant après une durée de 5, 15, 30,60 et 120 mn représente la stabilité de la mousse.

4.2.2. Propriétés émulsifiantes et stabilité des émulsions

5 mL de napines ou d'hydrolysat denapines à 10 % (p/v) sont placés dans un flacon gradué puis sont homogénéisés à l'aide d'un ultraturax à 8000 tr/mn, pendant 30 s. 2,25 mL d'huile de soja commerciale sont ajoutés et les mélanges sont homogénéisés à nouveau dans les mêmes conditions. 6,5 mL d'huile de soja sont encore ajoutés et homogénéisés pendant 90 s. L'émulsion est centrifugée à 1100 g pendant 5 mn à température ambiante. Le rapport entre le volume d'émulsion (en mL) après centrifugation et avant centrifugation représente l'activité émulsifiante (en %). Afin d'évaluer la stabilité de l'émulsion, les échantillons sont chauffés pendant 15 mn à 85 °C et, une fois refroidis, centrifugés à température ambiante (1100 g pendant 5 mn). L'activité émulsifiante restante après chauffage représente la stabilité de l'émulsion. Elle est calculée comme étant le rapport de volume (mL) d'émulsion après chauffage et avant chauffage.

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre I

*Mise en œuvre d'un procédé d'extraction sélectif de
napines de tourteau de colza industriel*

CHAPITRE I. Mise en œuvre d'un procédé d'extraction sélectif des napines de tourteau de colza industriel

1. INTRODUCTION	95
2. EXTRACTION SELECTIVE DES NAPINES ISSUES D'UN TOURTEAU DE COLZA INDUSTRIEL ET CARACTERISATION DE LEURS PROPRIETES ANTIFONGIQUES	95
2.1. Article : Selective extraction, structural characterization and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal	96
2.2. Contributions de l'article	114
2.3. Paramètres additionnels influents sur le procédé d'extraction sélective des napines.	115
2.3.1. Influence de la température sur l'extraction sélective des napines	115
2.3.2. Influence de la force ionique sur l'extraction sélective des napines	116
3. OPTIMISATION MULTICRITERES DU PROCEDE D'EXTRACTION SELECTIVE DES NAPINES DE TOURTEAU DE COLZA INDUSTRIEL	117
3.1. Manuscrit : "Multi-criteria optimization of a selective extraction of napins from an industrial rapeseed meal"	118
3.2. Contribution de l'article	135
4. EXTRACTION ET PURIFICATION DES NAPINES A L'ECHELLE PILOTE DE LABORATOIRE	135
4.1. Mise en œuvre du procédé de purification des napines par techniques membranaires	136
4.2. Analyse qualitative comparative des napines extraites à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote	139
4.2.1. Analyse par CLHP-PI des napines purifiées par techniques membranaires	140
4.2.2. Analyse structurale des napines purifiées par techniques membranaires	140

1. INTRODUCTION

Comme décrit dans la partie bibliographique, le tourteau de colza (résidu des graines après extraction de l'huile) est essentiellement utilisé en alimentation animale en raison de sa richesse en protéines. Parmi ces protéines, les napines (albumines 2S) présentent un intérêt considérable pour leurs propriétés anti-microbiennes. Une meilleure valorisation de ce co-produit agro-industriel peut être envisagée. Afin de caractériser les propriétés antifongiques envers des moisissures émergentes (famille des *Fusarium*), la première phase de cette étude a comme objectif d'évaluer qualitativement (sélectivité) et quantitativement (pureté et rendement) les facteurs influents lors du procédé d'extraction-purification de la protéine cible. La deuxième phase est dédiée à l'optimisation de ce procédé à l'aide d'un plan d'expériences. La condition d'extraction la plus performante ainsi définie est alors appliquée pour la production d'un stock de napines. Elles sont ensuite utilisées comme substrat pour l'étude de protéolyses enzymatiques diverses.

2. EXTRACTION SELECTIVE DES NAPINES ISSUES D'UN TOURTEAU DE COLZA INDUSTRIEL ET CARACTERISATION DE LEURS PROPRIETES ANTIFONGIQUES

Un certain nombre de facteurs a été pris en compte afin d'évaluer leur niveau d'influence sur la sélectivité et le rendement du procédé d'extraction. Ensuite, un procédé de purification en deux étapes (précipitation au sulfate d'ammonium suivi d'une chromatographie d'exclusion stérique) a été développé afin d'éliminer au maximum la fraction polyphénolique contenue dans l'extrait. En effet, ces composés sont bien connus pour réduire le potentiel biologique des protéines de colza (Ghodsvali *et al.*, 2005). L'isolat de napines ainsi obtenu est analysé par différentes techniques : dichroïsme circulaire, fluorescence et calorimétrie différentielle afin d'évaluer l'impact du procédé d'extraction-purification sur la structure protéique.

L'objectif final a été la validation du potentiel antifongique de ces napines sur la croissance d'un champignon filamentueux, *Fusarium langsethiae*. Ce pathogène est responsable de dégâts importants sur les céréales de la filière orge-malt-bière.

Les résultats de ce travail sont présentés sous forme d'un article, publié en avril 2012 dans la revue Food Chemistry, et intitulé : « Selective extraction, structural characterization and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal ».

2.1. Article

Selective extraction, structural characterization and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal.

Claudia Nioi, Romain Kapel, Emmanuel Rondags and Ivan Marc

ABSTRACT

This article reports an extraction-purification of napins from an industrial rapeseed meal and the assessment of their antimicrobial activity against *Fusarium langsethiae*. The better extraction conditions are observed at pH 2, 12 % (w/w) of rapeseed meal after 15 minutes of extraction in water at room temperature. In these conditions the extraction is highly selective, allowing to a simple purification process (ammonium sulfate precipitation followed by desalting size exclusion chromatography) to get purified napins. These napins revealed to have a significant anti-*Fusarium activity* ($IC_{50} = 70 \mu\text{M}$) and a compact secondary structure rich in α -helix which may explain this bioactivity.

Keywords:

napins, rapeseed meal, protein extraction process, selectivity, antifungal properties, *Fusarium langsethiae*.

1. Introduction

Rapeseed (*Brassica napus*) is a crop cultivated wide world having a high lipid and protein content (40 % to 45 % and 15 % to 30 % of the dry matter respectively) (Godon, 1985). The protein fraction is mainly composed of storage proteins, divided into globulins (12S cruciferins) and albumins (2S napins) (Aider & Barbana, 2011). Cruciferins are multimeric proteins of 350 kDa having an isoelectric point of 7.2 (Schwenke, 1994). Napins (12-15 kDa) are heterodimers composed of large (9-10 kDa) and small (4-4.5 kDa) subunits held together by weak bonds and disulfide bridges (Monsalve, Lopez-Otin, Villalba, & Rodriguez, 1991). They are, particularly basic (pI around 11), and account for 30 % to 50 % of the total seed proteins (Schwenke, 1994). Besides storage proteins, the rapeseed protein fraction is composed of oleosins (15-26 kDa) (Aider and Barbana, 2011) and other minor proteins, such as thionins, lipid transfer proteins (LTP) and trypsin inhibitors (Bérot, Compoin, Larré, Malabat, & Guéguen, 2005).

Rapeseed proteins exhibit a well-balanced amino-acids composition (Bos et al., 2007) and great techno-functional properties as protein dispersibility index, water absorption, fat absorption, emulsifying and foaming properties (Wu & Muir, 2008). Beside that, napins from *Brassica* species have interesting antimicrobial properties on various bacterial strains (Neumann, Condron, Thomas, & Polya, 1996a; Neumann, Condron, & Polya, 1996b). Antifungal activities against *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Alternaria brassicola*, *Botrytis cinerea* with good IC₅₀ (from 20 to 200 g.L⁻¹) were also reported (Terras et al., 1993a). The anti-*Fusarium* activity is of critical interest due to the growing occurrence of contamination of cereal cultures by *Fusarium langsethiae* observed around the past decade (Torp & Nirenberg, 2004). This particular species affects the cereal directly in the field, during degraded storage conditions and eventually during downstream processing such as malting for barley. This contamination is associated with agronomical losses due the cereal infection, and to economic losses and health concerns due to T2 and HT2 mycotoxins production. Several authors assumed that the antimicrobial activity of napins is due to its high content in positively charged aminoacids and a high proportion of α -helix in its secondary structure (Terras et al., 1993a). Indeed, this kind of properties is widely observed with numerous other antimicrobial polypeptides. Other authors pointed out a calmodulin antagonist effect and an anti-tryptic activity of napins that could limit microorganism growth (Neumann et al., 1996a, Terras et al., 1993b).

Nowadays, rapeseed is processed at industrial scale to produce oil for human consumption and biodiesel production (Wu et al., 2008). The oil extraction process leaves a solid side-product particularly rich in proteins called 'rapeseed meal' widely used as cattle food. Considering their good nutritional and techno-functional properties, rapeseed proteins can also be valorized in the field of human nutrition. For this purpose, the implementation of proteins extraction/purification processes from rapeseed meal is required. Many extractive conditions are gathered in a recent review (Rodrigues, Coelho, & Carvalho, 2011)). The better extraction of total rapeseed proteins was reported under basic conditions (ranging from 11 to 14) (Aluko, McIntosh, & Katepa-Mupondwa, 2005; Pedroche et al., 2004). Proteins purification from meal extracts are achieved either by (i) isoelectric precipitation (Chabanon, Chevalot, Framboisier, Chenu, & Marc, 2007), (ii) ammonium sulfate precipitation combined to size exclusion chromatography (SEC) (Dalgalarondo, Robin, & Azanza, 1986) or by (iii)

tangential filtration (Ghodsvali, Khodaparast, Vosoughi, & Diosady, 2005).

Antimicrobial activities shown by rapeseed napins would give a new pathway for rapeseed meal valorization. However, such bioactivities were observed with napins extracted from seeds in low-denaturing conditions. Furthermore, napins purification is reported to be time and cost consuming, implying nanofiltration step and several chromatography steps (two ion exchange chromatographies, one size exclusion and one hydrophobic interaction chromatography (Bérot et al., 2005)). The first part of this work proposes a simple extraction/purification process of napins from a rapeseed meal obtained at industrial scale in denaturing conditions (i.e. seed trituration at around 55 °C and oil n-hexane extraction). The second part is a structural study of the purified napins aimed at checking the impact of the napins purification process (from meal production to napins purification). The last part is a study of the antimicrobial activity of these rapeseed meal napins on *Fusarium langsethiae*, particularly involved in cereal contamination by mycotoxins.

2. Material and methods

2.1 Materials

The industrial defatted rapeseed meal, obtained by the prepress solvent extraction system was supplied by Robbe-Novance (Compiègne, France). The meal was grounded to pass through a 1 mm screen. This rapeseed contains 8 % (w/w) of water, 3 % (w/w) of residual oil and 38 % (w/w) proteins (estimated from Kjeldhal assay). Common reagents for extraction step (NaOH and HCl) were from Carlo Erba. Reagents for SDS-PAGE (acrylamide, tris, glycine, sodium dodecyl sulfate) were from Bio-rad. Ammonium sulfate for precipitation was from Sigma. Folin-Ciocalteu and gallic acid for phenols assay was also from Sigma. Glucose solution for carbohydrates assay was from Fisher Scientific.

2.2 Solid-liquid extraction steps

Solid-liquid extraction with an amount of solid and liquid phase of 100 g in an Erlenmeyer flask were carried out in order to assess the effect of extraction pH, meal concentration and extraction duration on the protein extraction. For the study of the pH effect, extractions at 5 % (w/w) of wet meal in water were performed at pH ranging from 2 to 11, at room temperature, during 30 min under magnetic agitation. HCl (5 N) and NaOH (1N) were used as acid and alkali for the pH adjustment.

After this step, the solid and liquid phase were separated by centrifugation at $13200 \times g$, room temperature for 30 min. Two samples of the aqueous phase were taken for protein quantification (Kjeldahl assay) and SDS-PAGE analysis. Considering the effect of meal concentration, extractions were carried out at pH 2, room temperature for 30 min at meal concentrations ranging from 3 % to 18 % (w/w). Samples of the aqueous phase were taken after 30 min and centrifuged as mentioned above. Liquid phases were submitted to a Kjeldahl assay for protein quantification. Finally, an extraction at pH 2 and 12 % (w/w) of meal was carried out for 60 min samples at 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 60 min were taken and centrifuged and submitted to the protein quantification in the aqueous phase (by Kjeldahl analysis).

2.3 Napins purification

The first step was a salting out precipitation by ammonium sulfate. The appropriate saturation for the napins precipitation was established by adding ammonium sulfate in 20 mL of aqueous phases obtained by extraction at pH 2, 12 % (w/w) meal after 15 min. Ammonium sulfate saturations ranging from 35 % to 65 % were assayed for 30 min at room temperature. Saturated solutions were then centrifuged at room temperature at $13200 \times g$. Pellets were solubilized in water (added in order to obtain a final volume of 20 mL). Supernatant and solubilized pellet were then analyzed by SDS-PAGE in order to choose the minimum saturation that leads to a full napins precipitation.

The second step was a desalting size-exclusion chromatography onto a G-25 column (1.6 x 10 cm). The column was loaded with a solution obtained after having solubilized napins precipitated (at 65 % ammonium sulfate in aqueous extract) with deionized water. The volume sample represented 12 % of the column bed volume (corresponding to 30 mg of proteins). The elution was achieved using an AKTA (GE Healthcare Life-Science, Orsay France) purifier system at $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with deionized water. Absorbance at 280 nm and 325 nm and conductivity were monitored on line.

2.4 Analysis

2.4.1 Proteins analysis

2.4.1.1 Quantification

Quantification of protein matter was achieved according to Kjeldahl procedure. To estimate total nitrogen in selective extraction of napins, a value of 5.70, calculated from napins sequence (Rico, Bruix, Gonzalez, Monsalve, & Rodriguez, 1996) was used for improved accuracy.

To estimate the non-protein part of nitrogen, 20 % TCA were mixed with protein extract (v/v) under stirred agitation for 10 min, and then centrifuged at $4500 \times g$ for 15 min. Non-protein nitrogen contained in the supernatant was analyzed by the Kjeldahl method. Protein nitrogen was calculated from the difference between total nitrogen and non-protein nitrogen.

2.4.1.2 SDS-PAGE

Electrophoresis gels (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide) based on the Laemmli method (Laemmli, 1970) were performed using 15 % (w/v) concentration of polyacrylamide in presence of 10 % of SDS. Each sample was prepared at around 1 g.L^{-1} of proteins in a solution of a bromophenol blue, with or without β -mercapto-ethanol. Then, the mixture was heated at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min. After migration of samples at 20 mA for 50 min, the gel was colored with a solution of Comassie R 250 blue. A standard molecular weight kit (Bio-Rad[®] Precision Plus Protein Standards) from 250 kDa to 10 kDa was used to determine the molecular weights of rapeseed meal protein extracts.

2.4.2 Carbohydrate assay

Sugars were determined by the Nelson-Somogyi method (Nelson, 1944). A volume of 0.4 mL of sample, mixed with copper reagent (v/v), was incubated at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ during 10 min. Cuprous oxide was formed and treated with 0.4 mL of arsenomolibdic acid. The blue color developed was read at 500 nm with Cary 50 UV-Vis spectrophotometer (Varian, Massy, France). The absorbance of sample was compared with standard curve, established with 1.67 mM glucose solution.

2.4.3 Polyphenolic compounds assay

The total polyphenol part was extracted by an acid hydrolysis and then quantified with the Folin - Ciocalteu reagent and compared with a calibration curve established with gallic acid according to the method described by the International Organization for Standardization (ISO 14502-1, 2005). The detailed procedure for preparation of gallic acid solutions was as follows. A solution of 40 g.L^{-1} of gallic acid was prepared and then diluted to obtain various

concentrations at 5, 10, 20 and 30 g.L⁻¹ to construct a calibration curve. Calibration solutions, properly diluted samples, and blank (0.5 mL) were in a first step submitted a hydrolysis with hydrochloric acid 4 N and 10 mL of ethanol at 90 °C during 2 h. Phenols extracted with ethyl acetate were thus dosed as follows: 1 mL of sample was mixed with sodium carbonate, Folin-Ciocalteu reagent (v/v) and incubated for 10 min at 38 °C. The color generated was read at 660 nm.

The absorbance was measured by Cary 50 UV-Vis spectrophotometer (Varian, Massy, France).

2.4.4 Ash content assay

The ash content was determined according to AOAC method (1990). The sample (0.5 g) was placed in a muffle furnace capable of maintaining temperatures between 500 °C - 600 °C during 12 h. Ash content was expressed as the ratio of weight sample after combustion over its dry weight.

2.5 Proteins structure assessment

2.5.1 Circular dichroism

The secondary structure of napins was recorded by using a CD6 dichrograph (Jobin Yvon, Longjumeau, France). Far-UV spectra were recorded between 185 nm and 250 nm, at 20 °C with a 1 mm path-length quartz cell and 2 nm bandwidth. The protein concentration was 10 mM and samples were dissolved in 20 mM phosphate buffer, pH 7. The results are reported as a mean residual ellipticity in degrees of square centimeters per decimole. All experiments were conducted in triplicate. The percentage of secondary structure was determined by Dicroprot method (Deléage & Geourjon, 1993).

2.5.2 Fluorescence measurement

Fluorescence spectra were recorded using a SPEX Fluorolog-3 spectrofluorometer (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermostated cell compartment (25 °C) having a 450 W Xenon lamp. Measurements were performed with napins under native conditions and after incubating napins with different concentrations of chemical denaturant (GdnHCl from 1 to 8 M) overnight before the measurements were performed. The excitation wavelength was 280 nm and the emission intensity was monitored at wavelength in the range of 320-450 nm. Protein concentration was 0.4 g.L⁻¹.

2.5.3 Differential Scanning Calorimetric measurement

Differential scanning calorimetric (DSC) was performed in a VP-DSC (MicroCal, North Hampton, MA, USA); Data were analysed by a Windows-based software package. All DSC experiments were achieved with a protein concentration of 7 g.L⁻¹ in phosphate buffer 20 mM, pH 7. Samples were degassed prior to load the DSC cell. The DSC scan rate was set to 10 °C.min⁻¹ for all experiments.

2.6 Antifungal assay

Antifungal activity assays were performed in Petri dishes ($\emptyset = 100$ mm), containing 10 mL of Yeast Malt Agar (YM) medium at napins concentrations ranging from 0 to 5.25 g.L⁻¹. The Petri dishes were inoculated centrally by a highly toxigenic *Fusarium langsethiae* strain isolated from the 2008 barley harvest. Cultures were incubated for five days at 25 °C under alternating light and darkness periods of 12 hours. Two colony diameter measurements were performed each day, taking into account minimal and maximal diameters values. Each experimental condition was performed in triplicate and colony growth rates were determined for each initial condition. IC₅₀ of napins for *Fusarium langsethiae* was the concentration of napins leading to a 50 % decrease of the colony growth rate compared with the standard culture without napins.

3. Results and discussion

3.1 Napins solid-liquid extraction from an industrial rapeseed meal

3.1.2 Effect of pH extraction on protein content

Proteins from rapeseed or rapeseed meal are classically extracted by a solid/liquid extraction step using aqueous phase. The influence of the pH, well known to be the main parameter impacting the protein extraction, was then investigated in a first place. Figure 1A displays the concentration of proteins assessed from nitrogen assayed by Kjeldahl analysis in the liquid phase after 30 min of extraction at pH ranging from 2 to 10 and at 5 % (w/w) of meals. The limits of this range were set to avoid any chemical proteolysis and to use a reasonable amount of alkali or acid. It can be observed that the highest protein concentration in the liquid phase is obtained at the highest pH (2.15 g.L⁻¹ at pH 10). From pH 10 down to 6, the protein extraction goes down (1.2 g.L⁻¹) and rises up by decreasing the pH to 2 (2.05 g.L⁻¹). Thus, the efficiency of protein extraction is clearly improved at 'extreme' pHs. This has widely been observed and might be explained by electrostatic repulsions.

Indeed, the major protein fraction (i.e. cruciferins) has an IP near neutrality (Schwenke, 1994).

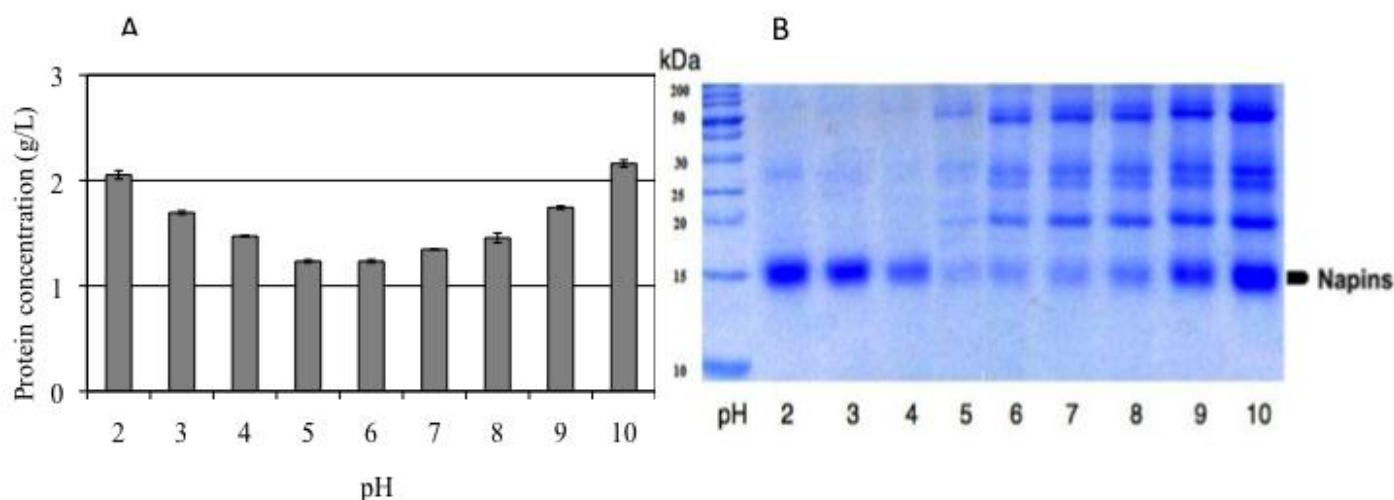


Fig. 1. A) Protein concentration in the supernatant obtained after centrifugation of 5 % (w/w) rapeseed meal in water at pH ranging 2 to 10, after 30 min of extraction at room temperature. (B) SDS-PAGE 15 % of polypeptides extracted (lane 2 to lane 10). Molecular weight markers in the range 200-10 kDa were run along with the protein (left lane). Concentration of loaded protein was 1 g.L⁻¹. The error bars are based on duplicate runs.

As a consequence, electrostatic repulsion between cruciferins should reach a maximum at acid and basic pH's and let expect improved extraction from solid meal under these conditions.

Napins IP is reported to be particularly high (IP = 11 according to Schwenke, 1994). So a selective extraction of napins under acidic conditions may be expected. To check that out, extracted proteins from pH 2 to 10 were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 1B). In figure 1B, lanes 10 down to 5 (corresponding to extraction pH from 10 to 5 respectively) show bands at around 50, 25, 20 and 15 kDa, whose were identified from molar masses as cruciferin β -subunits dimers, cruciferin β -subunits, cruciferin α -subunit and napins respectively.

Obviously, every band intensity goes fading away from lane 10 to 4. Lanes 4 down to 2 (corresponding to extraction pH from 4 to 2) only show the band of napins along with a slight band just below 30 kDa (that might be a dimer of napins). The more acid the extraction is, the more intense the napins band looks.

This clearly confirms that a selective extraction of napins takes place under acidic conditions and indicates that the better extraction pH is 2. However, two points are surprising: (i)

cruciferins bands intensities decrease from basic pH to pH 4 and do not rise under acidic conditions and (ii) napins band is intense under basic condition. Interestingly, other authors reported a selective extraction of alfalfa RuBisCO small subunit (IP around 6) at pH 2 from a solid concentrate containing other proteins (having IP close to neutrality). Obviously, this indicates that electrostatic repulsions probably act with other factors on protein extraction (as protein solvation difficulties at solid/liquid interface or strong protein/protein interactions in the solid). Napins concentration in the aqueous extract had to be improved since subsequent purifying and drying processes require to have concentrated starting material. The main parameter of the extraction step that could lead to napins extracted concentration improvement is clearly the starting meal concentration. Therefore, the effect of this parameter on the napins extraction was investigated.

3.1.2 Effect of meal concentration on napins extraction

Extractions at pH 2 and rapeseed meal concentration ranging from 3 % to 18 % (w/w) in water were carried out. Meal concentration higher than 18 % (w/w) revealed to be inappropriate since from this concentration, slurries became difficult to homogenize. Protein concentration and extracted proteins over meal amount used were determined in each condition (Fig. 2A). Protein concentration was still assayed from Kjeldahl analysis but in this case, a conversion factor of 5.70 calculated from napins sequence (Rico et al., 1996) was used. Figure 2A shows a linear evolution of the extracted protein concentration from 1.03 g.L⁻¹ to 6.39 g.L⁻¹ for meal concentration from 3 % to 18 % (w/w). The extracted proteins over meal amount ratio remains constant around 30 mg extracted proteins per gram of meal but decreases drastically at 15 % and 18 % meal (down to 15 mg.g⁻¹). This is due to a significant lowering in the aqueous extract volume obtained after centrifugation from an initial meal concentration of 15 %. From this result, the meal concentration of the extraction step was set at 12 % (w/w), which seems to be a good compromise between protein concentration in the extract and extraction yield. In this condition, the step productivity was around 1 mg.g⁻¹.min⁻¹ (mg of extracted proteins per gram of meal per minute of extraction). The productivity is directly linked to the extraction step duration. Therefore, the impact of the last parameter on the process productivity was considered by studying the kinetics of the protein extraction (at pH 2 and 12 % w/w of meal).

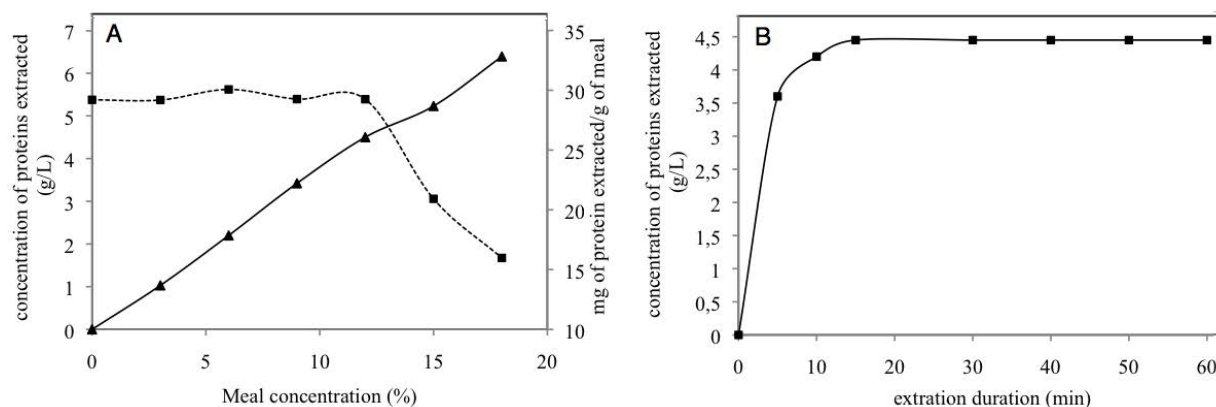


Fig. 2.A) Protein concentration in supernatant after 30 min of pH 2 extraction from rapeseed meal at 3 to 18 % (w/w). Protein concentration (black triangle) and quantity of protein extracted as a function of meal concentration (black square). Each sample was analyzed three times. Estimate error was ± 1.14 %. B) Protein concentration after extraction of 12 % (w/w) rapeseed meal in water at pH 2 for 5 to 60 min.

3.1.3 Effect of the extraction duration on napins extraction

The evolution of the protein concentration in the aqueous phase was followed during 60 min (Fig. 2B). Figure 2B shows that the concentration rises up during 15 min then remains constant at 4.5 g.L^{-1} . This indicates that, in this condition, the equilibrium is reached after 15 min. The productivity of the step using 15 min extraction duration was then doubled at around $2 \text{ mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Other studies dealing with total proteins extraction from rapeseed meal reported extraction times around 60 min (Bérot et al., 2005; Wu et al., 2008). The effect of the temperature on protein extraction could also have been investigated but this would probably have led to a partial destructure of the protein potentially impairing its anti-fungal bioactivity. Thus, the extraction condition chosen for the study will be pH 2 (guarantee of a napins selective extraction) with a 12 % (w/w) meal concentration during 15 min. The extract revealed to be composed of around 88 % of water and 22 % of a dry matter mainly constituted of proteins (around 25 %), free carbohydrates (4 %), polyphenolic compounds (7 %), ashes (10 %). The rest of the dry matter (around 50 %) is probably composed of salts. This high content in salt is probably due to the amount of HCl (6.82 g) added to keep the pH at 2 during the extraction step. Anyway, the extract is composed of napins (of around 15 kDa) and small molar weight compounds. Therefore, size-exclusion chromatography (SEC) in desalting mode

was chosen to purify napins since this process shows good productivities and is easy to scale-up.

3.2 Napins purification from the liquid extract by desalting SEC

Polyphenolic compounds are known to adsorb themselves to stationary phases. This leads to washing difficulties and increases elution time. Thus, a pre-purification step allowing a protein concentration and a partial elimination of polyphenols was required. A salting out precipitation using ammonium sulfate seemed adequate in view of the target set of the article since this kind of precipitation preserves protein structures. The large amount of salts used for the precipitation will be eliminated by the subsequent SEC step.

Napins were precipitated at 65 % of ammonium sulfate saturation and resuspended in water by a third of the initial volume (in order to increase napins concentration). A loss of coloration was observed after ammonium sulfate precipitation, indicating a partial elimination of polyphenols. This solution was loaded (12 % of the bed volume, i.e. 30 mg of proteins) onto a laboratory scale column (1.6 x 10) and eluted at a rate of 30 cm.h⁻¹ using deionized water. Absorbance at both 280 and 325 nm was recorded on line. These two wavelengths were chosen to distinguish the elution of proteins (absorbing UV at 280 nm) and polyphenols (absorbing UV at both 280 and 325 nm). The conductivity was trailed to ensure that protein fraction is separated from salts.

The chromatogram at 280 nm and 325 nm (fig. 3A) shows two well separated peaks at 10 (elution in the column void volume) and 46 minutes of (elution over 2 bed volumes). The conductivity is under a major peak at around 15 min. As expected, SDS-PAGE analysis (Fig. 3B) revealed that napins are eluted in the void volume. Indeed, the exclusion molecular weight of this stationary phase is given at around 5 kDa. This indicates that napins fraction is clearly free from minerals but remains slightly contaminated by polyphenolic compounds. The rest of the polyphenols is eluted after 2 bed volumes, denoting an adsorption onto the stationary phase. The contamination of the protein fraction can be due to a protein/polyphenol association. Xu and Diosady (2000) showed that such interactions exist between rapeseed proteins and polyphenols. These interactions may occur through weak (hydrogen bridges, hydrophobic interactions, salts bridges) or covalent bonds. Napins fraction from SEC was further analyzed by RP-HPLC (data not shown).

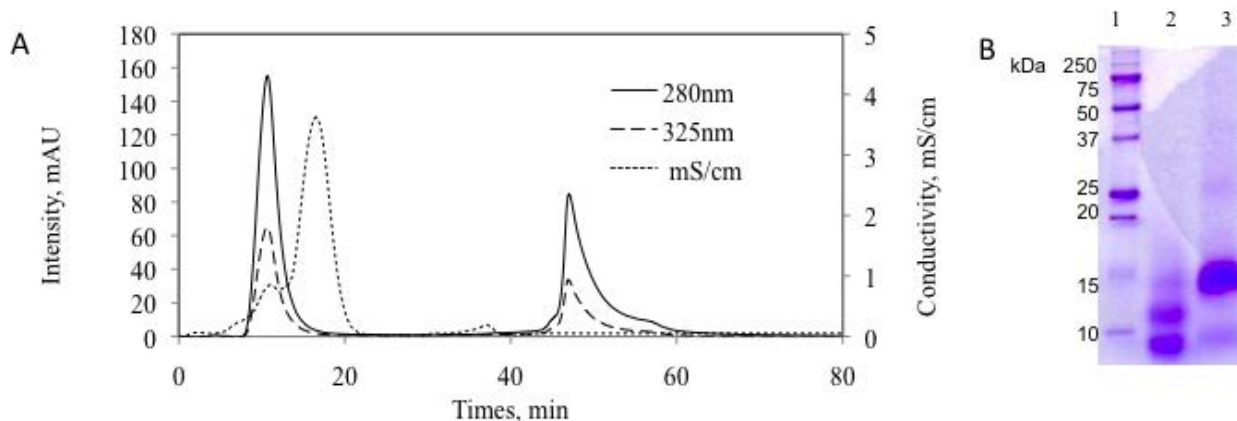


Fig. 3. A) Size exclusion chromatography (SEC) of napins extracts (at pH 2 using 12 % of rapeseed meal for 15 min) after precipitation with 65 % ammonium sulfate. SEC was performed on a Sephadex G-25, in water at 40 mL/min. Absorbance at 280 nm, 325 nm and conductivity was monitored on line. B) SDS-PAGE 15 % (w/v) pattern under reducing (line 2) and non reducing (line 3), of the first SEC fraction. Molecular weight markers (line 1) in the range 10-250 kDa were run along with the protein.

The chromatogram at 280 and 325 are under a single peak with the same retention time. This indicates that in spite of RP-HPLC dissociating elution conditions (acetonitrile/H₂O/trifluoroacetic acid mixture as mobile phase) polyphenols and napins remain associated. This supports the assumption of a strong association and possibly covalent bonds. The fraction was analyzed by SDS-PAGE in reducing (with β -mercaptoethanol) and non reducing (without β -mercaptoethanol) conditions. The gel obtained is presented in figure 3B. Under non reducing conditions (lane 3), the profile is under a major band at 15 kDa previously identified as napins, the band at around 30 kDa (which was meant to be napins dimers, according to Tan, Mailer, Blanchard & Agboola, 2011) and a band at 10 kDa. In reducing condition (lane 2), three bands at around 5, 10 and 15 kDa can be seen. This confirms the identification of the band at 15 kDa as napins since this kind of protein is known to be a heterodimer of large and small subunits of around 10 kDa and 5 kDa respectively. The hypothesis of a napins dimer held by disulfide bond for explaining the presence of the 30 kDa band in the non reducing gel also appeared to be reinforced. Finally, protein fraction represented more than 92 % of the dry matter, which let think that the SEC step was enough for napins purification. Thus, a simple process based on a simple solid/liquid extraction, a pre-purification step by salting out protein precipitation and a SEC allow to get a purified fraction

of napins from a rapeseed meal generated at industrial scale. Interestingly, this process can be easily scaled up to mass-produce napins. A replacement of the salting out precipitation should be thought to avoid the use of large amounts of salts. This could be easily done by tangential filtration for example. The rapeseed meal used in the study was produced by an industrial rapeseed oil process extraction including a seed trituration step at around 55 °C and a n-hexane extraction step. These steps can be particularly denaturing for proteins and leading to a loss in the anti-microbial potential of napins. The following part will be devoted to study the structure of our purified napins.

3.3 Rapeseed meal napins structural analysis

First, napins were analyzed by circular dichroism (CD) in far UV (185-200 nm). CD spectra of napins were obtained at 25 °C in phosphate buffer pH 7 (Fig. 4). In far UV region CD spectrum gives informations on secondary structures. The spectra show two elipsity minima at 222 and 208 nm. This is characteristic of high content in α -helix. From the spectrum, napins revealed to be composed of 37 % of α -helix and 11 % of β -sheet. Interestingly, such a high amount of α -helix was previously observed with native napins from different *Brassicaceae* seeds (*B.napus*, Wu and Muir, 2008; *B.juncea*, Jyothi, Sinha, Singh, Surolia, & Appu Rao, 2007). This tends to indicate that the secondary structure of napins has not been affected drastically during oil industrial process and our extraction/purification procedure.

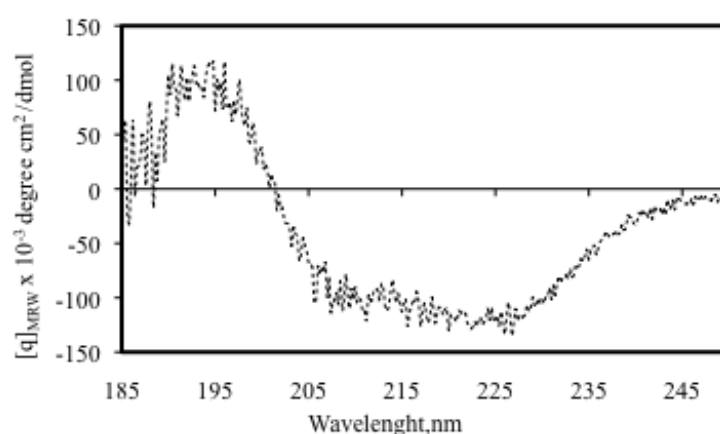


Fig. 4. CD spectrum in the far-UV region (185-250 nm) of napin purified. Scan was recorded using a cell with 1 mm path length. Napins at 10 μ M were diluted in phosphate buffer 20 mM (pH 7.0). Spectrum with two minima at 208 nm and 222 nm indicates a predominance of the α -helix structure.

Then, we focused on napins tertiary structure. To investigate protein tertiary structure deconstruction, the intrinsic fluorescence of tryptophan is frequently used since a shift in fluorescence occurs as it is exposed to a polar environment. In 2007, Jyothi et al. studied the impact of guanidinium chloride (GdnHCl), a strong chaotropic agent, on the tertiary structure of native *Brassicacae* napins. The same protocol was applied to our rapeseed meal napins. Fig. 5 shows a red shift (increasing of λ_{\max} from 349 nm to 357 nm) as GdnHCl concentration increases. As expected, this denotes an aqueous solvent exposition of tryptophan side chains, thus unfolding of protein. The interesting point lies on the three states observed in the range of 0.5-2 M, 4-5 M and 7-8 M GdnHCl. Indeed, Jyothi et al. also observed such a three states denaturing pattern (at the same GdnHCl concentration) with native napins. This tends to show that napins extracted from our industrial rapeseed meal have a tertiary structure similar to native ones. The oil extraction process seems to have not affected much napins structure.

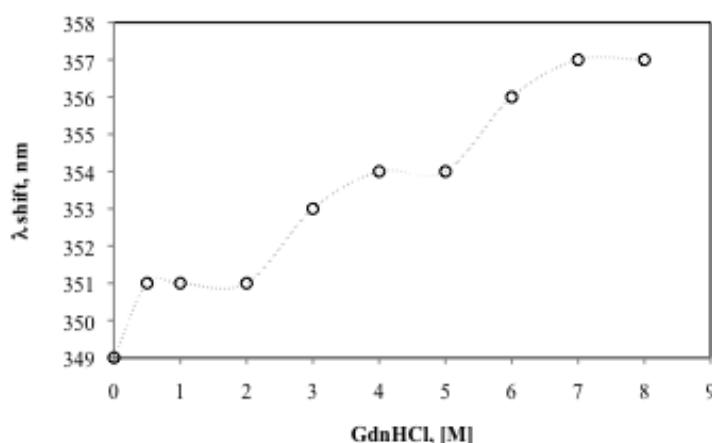


Fig. 5. Shift in the fluorescence emission wavelength maxima as a function of denaturant (GdnHCl) concentration.

Finally, to check that assertion out, the thermal stability of our napins was measured by DSC thermogram (Fig. 6). Figure 6 shows a high endothermic peak at 102 °C, as in Wu et al. (2008) whose investigated thermal stability of *Brassica napus* napins. This high denaturing temperature is likely to be due to the compact structure of napins and its high content in stabilizing secondary structures (as helix and sheets) as evoked by Jyothi et al., (2007) and Moreno, Mellon, Wickham, Bottril & Mills (2005).

This could explain that no extensive denaturation occurred during the oil extraction process or the napins extraction/purification process.

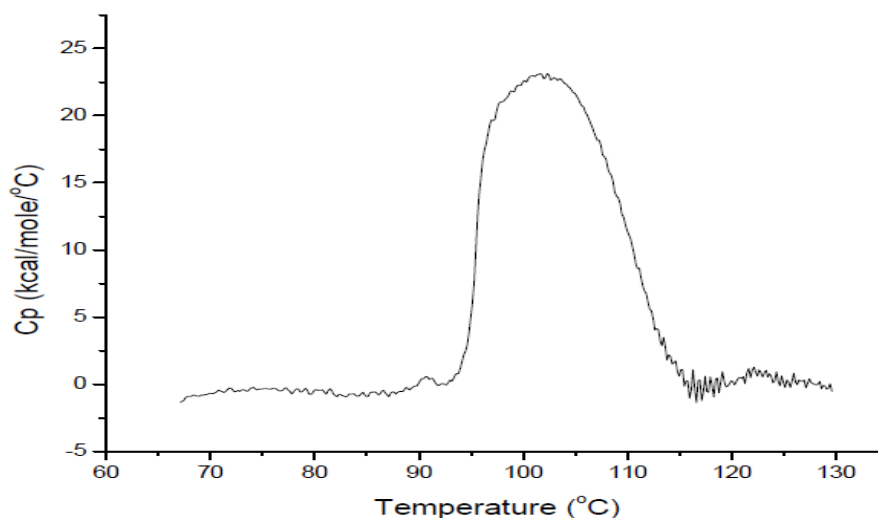


Fig. 6. Differential Scanning Calorimetry (DSC) of napins from rapeseed meal. DSC thermogram showing temperature for the thermal denaturation of napins (T_m 103 °C). Protein concentration was 7 g.L⁻¹ in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) and a scan rate of 1 °C.min⁻¹.

This let think that the anti-microbial potential of our napins could be entire. Such a bioactivity was assessed on *Fusarium langsethiae*, a fungus strain that grows on cereals and causes a food safety problem.

3.4 Antifungal bioactivity on *Fusarium langsethiae*

The antifungal napins activity was tested against the highly toxigenic and emergent *Fusarium langsethiae*. This activity was determined under the form of IC₅₀ on Petri dishes cultures containing 0 g.L⁻¹ to 5.25 g.L⁻¹ of napins. Figure 7 displays basic Petri dishes aspects after 4 days and the corresponding IC₅₀ curve. The antifungal effect of napins clearly appears in figure 7A, with an associated IC₅₀ value of 70 μM (Fig. 7B). This result confirms the antifungal bioactivity of napins from *Brassica* species already observed by Terras et al. (1993a) with rapeseed 2S albumins fraction (assumed to be napins).

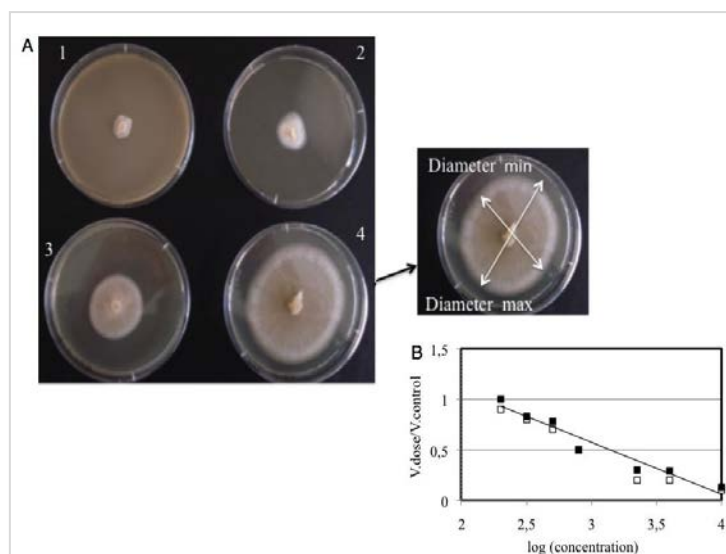


Fig. 7. A) Evolution of diameter growth of *F. langsethiae* in presence of 5.25 g.L⁻¹, 1.31 g.L⁻¹, 0.16 g.L⁻¹ of napins after 5 days (Petri dish n° 1, 2, 3 respectively) and control without napins (Petri dish n° 4). B) Effect of various concentrations of napins on growth of *F. langsethiae*. IC₅₀ value is 70 μM. Comparison is done on measuring *Fusarium* growth diameters max (black square) and min (white square).

Recently, it was demonstrated that a napins-like polypeptide with high thermostability often exhibits antifungal properties (Lin & Ng., 2008). Studies by Powers and Hancock (2003) have shown two structural requirements for antimicrobial activity: (i) a cationic charge and (ii) an amphipathic conformation. Rapeseed napins with their high arginine and lysine content, and amphipathicity fully comply with these two requirements. What is more, napins can also interact synergistically with thionins whose produce fungal membrane damage (Terras et al. 1993b). In another antimicrobial mechanism model, amphipathic α -helix structure of napins from *Brassicaceae* may be involved in the CaM (calmodulin) antagonist and can form pores in membranes (Neumann et al., 1996a). This is probably because CaM and two subunits of napins contain similar α -helix. Another assumption concerning the antifungal mechanism of napins could be due to a protease inhibiting capacity, which could cause an alteration of protein metabolism (Neumann et al., 1996b).

This work provides data confirming the antifungal potential of napins from *Brassicaceae*.

But, the originality of this work lies on the fact that such activity is observed with napins from an industrial side-product of rapeseed oil extraction. Indeed, such a denaturing process (implying heat treatment steps at 55 °C and 105 °C and a solvent extraction) could have destructurated napins and caused a loss in antifungal potential.

4. Conclusion

This study presents an original method for extracting/purifying napins from an industrial rapeseed meal. Extraction conditions at pH 2, have been shown to allow a selective extraction of napins. The extraction is also influenced by rapeseed meal concentration and extraction duration. The better conditions observed in this work are a 12 % (w/w) of rapeseed meal concentration and an extraction duration of 15 min at room temperature. The extracted napins revealed to have similar structural shape than native napins, indicating that industrial oil extraction process did not cause a drastic napins denaturation. Our napins show a promising activity for *Fusarium langsethiae* growth inhibition, which could be used either to complement phytosanitary molecules employed in the field, or to improve cereals storage conditions and duration. The demonstration of that bioactivity opens an interesting valorization field of the rapeseed meal in the area of food safety. However, this will require to replace the ammonium precipitation step by a more productive one (i.e. diafiltration with UF membrane) and to further characterize the bioactivity (particularly the impact of napins on *Fusarium* mycotoxins releasing).

References

- Aider, M., & Barbana, C. (2011). Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - A practical and critical review. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 21-39.
- Aluko, R. E., McIntosh, T., & Katepa-Mupondwa, F. (2005). Comparative study of the polypeptide profiles and functional properties of *Sinapis alba* and *Brassica juncea* seed meals and protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1931-1937.
- A.O.A.C. (1990). *Official methods of analysis*, 15th ed. Arlington. Association of Official Analytical Chemists- Washington, D.C.
- Bérot, S., Compoin, J. P., Larré, C., Malabat, C., & Guéguen, J. (2005). Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.). *Journal of Chromatography B*, 818, 35-42.

- Bos, C., Airinei, G., Mariotti, F., Benamouzig, R., Bérot, S., Evrard, J., Fénart, E., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2007). The Poor Digestibility of Rapeseed Protein Is Balanced by Its Very High Metabolic Utilization in Humans. *The Journal of Nutrition*, *137*, 594-600.
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., & Marc, I. (2007). Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*, *42*, 1419-1428.
- Dalgalarrodo, M., Robin, J. M., & Azanza, J. L. (1986). Subunit composition of the globulin fraction of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Science*, *43*, 115-124.
- Deléage, G., & Geourjon, C. (1993). An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Computer Application in the Bioscience*, *9*, 197-199.
- Ghodsvali, A., Khodaparast, M. H. H., Vosoughi, M., & Diosady, L. L. (2005). Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties. *Food Research International*, *38*, 223-231.
- Godon, G. (1996). Protéines végétales. Eds Lavoisier, (Chapter VI).
- ISO 14502-1: 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent
- Jyothi, T. C., Sinha, S., Singh, S. A., Surolia, A., & Appu Rao, A. G. (2007). Napin from *Brassica juncea*: Thermodynamic and structural analysis of stability. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1774*, 907-919.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Lin, P., & Ng, T.B. (2008). A novel and exploitable antifungal peptide from kale (*Brassica alboglabra*) seeds. *Pepides*, *29*, 1664-1671.
- Monsalve, R. I., Lopez-Otin, C., Villalba, M., & Rodriguez, R. (1991). A new distinct group of 2 S albumins from rapeseed: Amino acid sequence of two low molecular weight napins. *FEBS Letters*, *295*, 207-210.
- Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickham, M. S. J., Bottrill, A. R., & Mills, E. N. C. (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal*, *272*, 341-352.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, *153*, 375-380.
- Neumann, G. M., Condrón, R., Thomas, I., & Polya, G. M. (1996a). Purification and sequencing of multiple forms of *Brassica napus* seed napin large chains that are calmodulin antagonists and substrates for plant calcium-dependent protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1295*, 34-43.
- Neumann, G.M., Condrón, R., & Polya, G. M. (1996b). Purification and sequencing of yellow mustard seed napin small and large chains that are phosphorylated by plant calcium-dependent protein kinase and are calmodulin antagonists. *Plante Science*, *119*, 49-66.

- Pedroche, J., Yust, M. M., Lqari, H., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., & Millan, F. (2004). *Brassica carinata* protein isolates: chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis. *Food Chemistry*, 88, 337-346.
- Powers, J. P. S., & Hancock, R. E. W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24, 1681-1691.
- Rico, M., Bruix, M., Gonzalez, C., Monsalve, R. I., & Rodriguez, R. (1996). 1H NMR assignment and global fold of napin Bn1b, a representative 2S albumin seed protein. *Biochemistry*, 35, 15672-15682.
- Rodrigues, I.M., Coelho, J.F.J., Carvalho, M.G.V.S. (2011) Isolation and valorization of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*. 109, 337-346.
- Schwenke, K.D. (1994) Rapeseed proteins. In Hudson J.F., editor. *New and developing sources of food proteins*. (pp. 281-306). London, U.K.: Chapman and Hall.
- Tan, S.H., Mailer, R.J., Blanchard, C.L., & Agboola, S.O. (2011). Canola Proteins for Human Consumption: Extraction, Profile, and Functional Properties. *Journal of Food Science*, 76, R16-R28.
- Terras, F. R., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (1993a). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Letters*, 316, 233-240.
- Terras, F., Schoofs, H., Thevissen, K., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B., & Broekaert, W. F. (1993b). Synergistic Enhancement of the Antifungal Activity of Wheat and Barley Thionins by Radish and Oilseed Rape 2S Albumins and by Barley Trypsin Inhibitors. *Plant Physiology*, 103, 1311-1319.
- Torp, M., & Nirenberg, H.I. (2004). *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *International journal of Food Microbiology*, 95, 247-256.
- Wu, J., & Muir, A. D. (2008). Comparative Structural, Emulsifying, and Biological Properties of 2 Major Canola Proteins, Cruciferin and Napin. *Journal of Food Science*, 73, C210-C216.
- Xu, L., & Diosady, L. L. (2000). Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media. *Food Research International*, 33, 725-731.

2.1. Contributions de l'article

Les résultats de cet article ont permis de mettre en évidence que le procédé d'extraction sélective des napines est influencé par le pH, la concentration en tourteau et la durée de réaction. Par ailleurs, la sélectivité du procédé d'extraction des napines à pH 2, permet de simplifier leur purification. En effet, il est montré que seulement deux étapes, une de concentration par précipitation au sulfate d'ammonium (saturé à 65 %) et une de dessalage par chromatographie liquide basse pression d'exclusion de taille, sont suffisantes pour obtenir un isolat de napines. L'étude en dichroïsme circulaire, fluorescence et calorimétrie différentielle à balayage, montre que les procédés d'extraction et de purification mis en œuvre ne modifient pas la structure de la protéine. De plus, la validation de l'activité antifongique envers *Fusarium langsethiae* est très prometteuse pour la valorisation aussi bien des napines que du tourteau dans le secteur de la sécurité sanitaire.

2.2. Paramètres additionnels influents sur le procédé d'extraction sélective des napines.

Après avoir fait émerger l'importance du pH, du temps de réaction et du ratio solvant/tourteau dans l'extraction sélective des napines, une étude plus approfondie a été conduite pour explorer l'influence d'autres paramètres. Puisqu'il est connu que la température et la force ionique du milieu réactionnel peuvent influencer l'extraction des protéines (Shen *et al.*, 2008 ; Pickardt *et al.*, 2009 ; Arifin *et al.*, 2009), dans un second temps, nous nous sommes intéressés à ces deux facteurs et leur effet sur notre procédé.

2.2.1. Influence de la température sur l'extraction sélective des napines

L'effet de la température sur la concentration des napines extraites sélectivement, leur pureté et le rendement en protéines (Figure 25) est évalué. La gamme de température étudiée est comprise entre 20 °C et 65 °C. Des températures supérieures n'ont pas été étudiées au vu des risques connus de dénaturation de la protéine et de coûts énergétiques accrus.

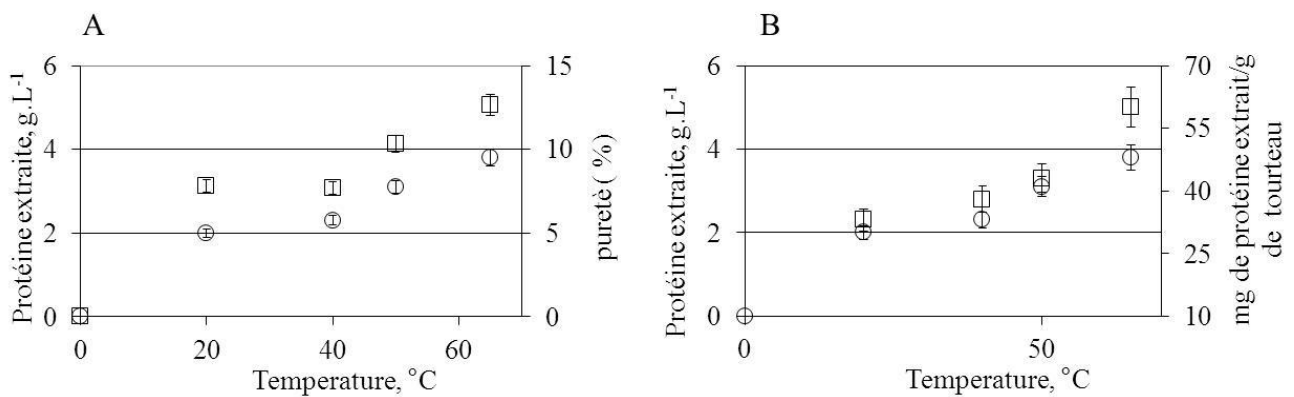


Figure 25. Concentration en protéine dans le surnageant après 15 mn d'extraction à pH 2, avec un titre en tourteau de 12 % (p/p) à différentes températures (○). A) Influence de la température sur la pureté protéique (□). B) Influence de la température sur la productivité du procédé d'extraction (□).

D'après les résultats obtenus (Figure 25 B), il est possible d'observer que l'augmentation de la température accroît la concentration des protéines extraites de 2 g.L⁻¹ à 3,9 g.L⁻¹. De même, la pureté protéique (évaluée par rapport à la matière sèche) augmente de 7 % à 13 %. Le rendement du procédé (mg de protéine par g de tourteau) s'accroît de façon notable avec l'augmentation de la température : de 33 mg.g⁻¹ à 20 °C jusqu'à 60 mg.g⁻¹ à 65 °C (Figure 25

B). Il est donc évident que la température influence significativement le procédé d'extraction des napines. Afin d'évaluer l'effet de ce paramètre sur la sélectivité des extractions, les surnageants ont été analysés par SDS-PAGE. Les profils électrophorétiques sont montrés dans la Figure 26. Le surnageant extrait à 20 °C (puits 1) est caractérisé par une bande intense à 14 kDa, ce qui correspond à la taille moléculaire des napines. La bande devient plus intense pour les surnageants extraite à 40 °C (puits 2), 50 °C (puits 3) et 65 °C (puits 4), ce qui est en accord avec les résultats précédents (Figure 25). En revanche, les puits 3 et 4 nous informent de la présence d'une bande de faible intensité autour de 50 kDa. Cette bande est identifiée comme étant une des sous-unité des cruciférines (Wu et Muir, 2008). Ainsi, l'augmentation de la température, dans ces conditions opératoires, favorise l'extraction des protéines au détriment de la sélectivité du procédé. Ceci peut être expliqué par une augmentation de la solubilité des protéines totales à haute température (Zhang *et al.*, 2009 ; Kumoro *et al.*, 2012).

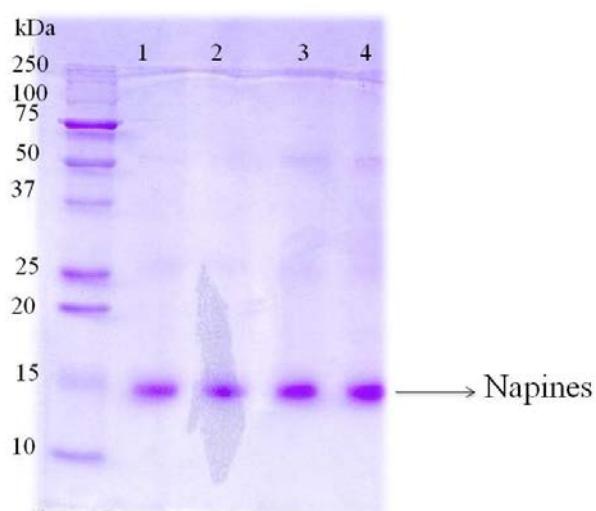


Figure 26. Profils électrophorétiques par SDS-PAGE (à 15 % de polyacrylamide) des extraits obtenus à pH 2, à une concentration en tourteau de 12 %, pendant 15 mn à 20 °C (puits 1), 40 °C (puits 2), 50 °C (puits 3) et 65 °C (puits 4).

2.2.2. Influence de la force ionique sur l'extraction sélective des napines

Il est connu que l'addition de sels améliore l'extraction des protéines en favorisant les interactions solvant-protéines (Pickardt *et al.*, 2009). C'est pourquoi, pour déterminer l'effet de la force ionique sur l'extraction des napines, des extractions ont été effectuées en présence de trois différents sels : NaCl, CaCl₂ et MgCl₂, à des concentrations comprises entre 0,5 et 1 M. A chaque sel correspond une valeur propre de chaotropie propre selon la classification d'Hofmeister (Zhan et Cremer 2006). Les extractions en présence de ces sels sont réalisées à

pH 2, avec une concentration en tourteau de 12 % (p/p), à température ambiante pendant 15 mn à température ambiante. La Figure 27 présente l'effet de sels sur la quantité de protéines extraites. On observe qu'en présence de 0,5 M de NaCl, la concentration de protéine extraite se situe à environ 1 g.L⁻¹. Cette concentration diminue jusqu'à 0,6 g.L⁻¹ à 1 M de NaCl. Pour les deux autres sels (0,5 M) la concentration en protéines est d'environ 1,5 g.L⁻¹ et elle diminue, comme dans le cas précédent, lorsque la concentration en sels augmente. La concentration des protéines extraites en présence des sels (de 0,6 à 1,5 g.L⁻¹) est plus faible par rapport à celle obtenue en leur absence (2 g.L⁻¹). Ainsi, cette étude montre que les sels ne favorisent pas le procédé d'extraction des napines. Pour conclure, nous avons montré que :

1. la température est un paramètre significativement influent sur le procédé d'extraction sélectif ;
2. la présence de sels n'améliore pas la quantité de protéine extraite.

C'est pourquoi la température sera un des facteurs, avec le pH, le titre en tourteau et la durée d'extraction, pris en considération pour l'optimisation subséquente à l'aide d'un plan d'expériences.

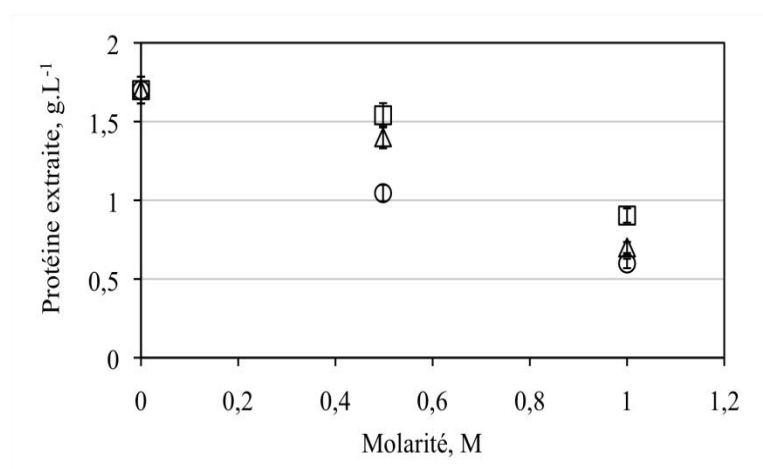


Figure 27. Effet du NaCl (○), du CaCl₂ (□) et du MgCl₂ (△) sur la concentration des protéines extraites à pH 2, avec une concentration en tourteau de 12 % (p/p), pendant 15 mn à température ambiante.

3. OPTIMISATION MULTICRITERES DU PROCEDE D'EXTRACTION SELECTIVE DES NAPINES DE TOURTEAU DE COLZA INDUSTRIEL

Les travaux présentés dans la phase préliminaire ont permis de déterminer les paramètres les plus influents sur le procédé d'extraction sélective des napines. Toutefois, ces paramètres ont été étudiés de façon séquentielle et indépendamment l'un de l'autre. Afin

d'évaluer l'effet conjugué de tous les facteurs influents et d'optimiser le procédé d'extraction, un plan expérimental a été réalisé. Les critères d'optimisation choisis sont : la concentration en napines extraites sélectivement, la pureté et le rendement en protéine. Ces critères quantitatifs sont associés à une analyse qualitative visant à évaluer le taux d'association polyphénols/ napines. La quantité d'HCl consommée pendant l'extraction acide est aussi prise en compte dans notre modèle afin de considérer l'aspect économique du procédé lors du choix de la condition optimale. Le choix de la condition optimale est fait par une approche de « Génie décisionnel ». Ces travaux sont rassemblés dans une publication soumise le 16 mai 2013 à *Process Biochemistry*, intitulée : « Multicriteria optimization of a selective extraction of napins from an industrial rapeseed meal ».

3.1. Manuscrit : “Multi-criteria optimization of a selective extraction of napins from an industrial rapeseed meal”

Claudia Nioi, Frantz Fournier, Arnaud Aymes, Ivan Marc, Romain Kapel

ABSTRACT

This study reports an original methodology to optimize the performance of a selective napins extraction from an industrial rapeseed meal. This methodology by using a response surface methodology (RSM) is based on decision engineering. The model equation was proposed with regard to the synergistic effect of pH, solid-liquid ratio, temperature and extraction duration on (i) the amount of napins extracted selectively, (ii) their purity and (iii) extraction yield. The model proposed includes an economical aspect by taking into account the amount of acid used. The best trade off conditions found were pH = 2, with an initial rapeseed meal concentration of 13 % (w/w), a temperature of 57 °C and 15 min of extraction duration to obtain the highest napins concentration (2.5 g.L⁻¹) with a productivity of 1.3 mg of protein.g⁻¹ of meal.min⁻¹. The napins extracted in optimum conditions remain weakly associated with phenolic compounds but kept totally their “native structure”.

Keywords: RSM, face-centered central composite design, multicriteria optimization, solid-liquid extraction, rapeseed napins

1. Introduction

Proteins from various plant sources have demonstrated interesting nutritional and techno-functional properties for decades. This is specially the case with proteins from cereals like wheat^[1] and maize^[2] from oilseeds like soy^[3] rapeseed^[4] or legumins^[5] which revealed to be a credible alternative to animal proteins in food, cosmetics or nutraceuticals industry. The production of isolates or concentrates of proteins from these sources requires the implementation of a solid/liquid extraction step followed by protein purifications from the liquid extract. This is classically achieved either by isoelectric precipitation or tangential filtration^[6].

The solid/liquid extraction is done using aqueous solutions as extractive liquid phases. Many operating conditions like pH, solid/water ratio, temperature, ionic strength, and extraction duration were reported to affect proteins extraction^[7,8]. In general, proteins purity, extraction yield and proteins concentration in the extract are considered. Other criteria like polyphenols/proteins association may be taken into account since polyphenolic compounds are responsible for a yellow to brown colour of final products^[9].

In many articles, the effects of operating conditions on the protein extraction are often investigated separately^[10]. But for this strategy, a large amount of experiments are needed to get reliable informations. Furthermore, synergistic effects between parameters are disregarded. To overcome this, the response surface methodology (RSM), which is a statistical tool, can be used for modelling and optimizing several process variables. This methodology has proven to be efficient in the optimization of the proteins extraction from plant meals, like palm kernel and defatted sunflower^[7,11]. The efficiency of the methodology is particularly high when a single criterion has to be optimized^[12] but if several criteria are to be considered, the optimization of one criterion by RSM is then at the expense of another one. This issue is usually by-passed by defining a linear combination of the criteria to convert the problem into a mono-criterion optimization problem^[13]. However, this implies the evaluation, by the decision maker, of the weight to attribute to each criterion *a priori*. A better alternative consists in constructing a multidimensional space containing the compromise among the different responses. This approach is known as “Pareto-optimality” and the responses domain is called “Pareto-front” which is associated to the “Pareto-Domain” of the variable^[14]. Then, the optimized solution is selected by the decision maker in the Pareto-Domain, using decision engineering tools. This way, preferences of the decision-maker are considered *a posteriori*. To our knowledge, that methodology has never been applied for a multicriteria optimization of proteins extraction from plant sources.

Rapeseed meal is a side-product obtained after industrial oil extraction process from rapeseed. This side-product is particularly interesting for proteins extraction because of its high content in proteins (about 40 % of rapeseed meal on the basis of the dry matter) and its availability; the global production of cakes has increased 150 % over the past 20 years and it reached 260 million tons in 2008. Among rapeseed proteins, napins, representing around 35 % of rapeseed proteins, are well known to exhibit interesting nutritional and functional properties^[9,15] and antimicrobial activity that could be applied in the field of food safety^[4,16]. Napins are low molecular weight proteins (12-14 kDa), composed of a large and a small chains linked by two disulfide bonds, intra and inter chains. Their isoelectric point is reported to be very high (near to 11), mainly due to high content in basic amino acids^[17].

Recently, we demonstrated that a selective extraction of napins from an industrial rapeseed meal can be achieved at laboratory scale under acid conditions (pH 2 to 4). The aim of this study is to optimize the napins selective extraction step. On one hand, the ratio meal over water, pH, temperature and extraction duration were considered as operating conditions. On the other hand, the criteria to optimize were the extraction yield, napins purity in the extract, polyphenols/napins association and the amount of acid used. A face-centered central composite design (FCCC) was applied in order to study the combining effect of the operating conditions on the different criteria. The selection of the best trade-off between all criteria was based on decision engineering^[18,19]. The structure of the napins extracted in the optimized condition was investigated by circular dichroism in order to assess the impact of the extraction conditions. The selectivity of the extraction toward napins was also checked by SDS-PAGE.

2. Material and methods

2.1. Material

The industrial defatted rapeseed meal, obtained by the prepress solvent extraction system was supplied by Robbe-Novance (Compiègne, France). This meal contains 8 % (w/w) of water, 3 % (w/w) of residual oil, 38 % (w/w) of proteins and the remaining 51 % (w/w) consists in ligno-cellulosic compounds, polyphenols and minerals. The common reagents for the extraction step (NaOH and HCl) were from Carlo Erba, Val de Reuil, France). SDS-PAGE reagents were purchased from Bio-Rad. All other reagents were of analytical grade.

2.2. Solid-liquid extraction

Solid-liquid extractions were carried out in a 2 L thermo-regulated reactor equipped with Rushton impellers Applikon, Bio controller ADI 1030, Saint-Paul Trois-Châteaux, France). Appropriate amounts of defatted meal were added in a reactor with deionized water to obtain different meal concentrations as defined in the experimental design conditions: 3, 9 and 15 % (w/w). Temperature was regulated with a thermostat and pH was adjusted with 5 N HCl under agitation (400 rpm) during appropriate times as established in design. The final extracts were centrifuged at 9,000 g for 30 min. Supernatants obtained after centrifugation were filtered through a filter 0.8µm -0.4 µm (Sartopore 2 Mini Cartridge, Aubagne, France) and preserved at -20 °C for quantitative analysis by Kjeldhal method.

2.3. Proteins quantification

Proteins concentration in extracts was measured from nitrogen titration by the Kjeldhal method using a conversion proteins/nitrogen factor of 5.70^[4]. The method consists of heating a sample mixture (2 mL of sample, 2 mL of sulphuric acid at 95 % (v/v), 1 mL of hydrogen peroxide and 0.2 g of catalyst) at 400 °C for 150 min by using a Kjeldatherm Digestion System (Gerhardt, Brackley, UK). After the mineralization step, the sample was distilled (Gerhardt Vapodest VAP 20, Brackley, UK) with sodium hydroxide, which converts the ammonium salts to ammonia. The amount of ammonia present was determined by back titration with 0.01 N sulphuric acid and 3 % boric acid. For a control test, sample was replaced by deionized water. For each extract, total nitrogen concentration (TN) was assayed to give the total nitrogen concentration by using the following formula (eq. 1):

$$(TN) = \frac{V_{assay} - V_{blank}}{V_{sample}} \times (H_2SO_4) \quad (1)$$

where V_{assay} and V_{blank} are the volume of sulphuric acid (L) for back titration of sample and blank respectively; (H_2SO_4) is the concentration of sulphuric acid (M); M_N is the nitrogen molar weight ($g \cdot mol^{-1}$) and V_{sample} is the sample volume used (L).

In such complex mixtures, the total amount of nitrogen is divided into proteins and non-protein molecules (peptides, aminoacids, nucleic acids...). So, 20 mL of extract was adjusted at 20 % (v/v) of trichloroacetic acid (TCA) by 20 mL of TCA 40 % (v/v) and stirred for 10 min at room temperature prior a 15 min centrifugation at 4,000 g. In these conditions, the proteins are meant to precipitate while non-protein molecules remain in solution. Nitrogen was assayed in the supernatant by the Kjeldahl method to give the non-protein nitrogen

(NPN) concentration. Thus, protein (napins) concentration in the extracts (P) were calculated as follows (eq. 2):

$$(P) = ((TN) - 2(NPN)) \times 5.7 \quad (2)$$

The purity of the extract (%) in proteins (napins) was calculated as the protein concentration over dry matter concentration (DM) ratio (eq. 3):

$$Purity (\%) = \frac{(P)}{(DM)} \times 100 \quad (3)$$

The dry matter concentration was estimated by drying 2 mL of extract at 105 °C during 48 h from the weight of the dry residual.

The proteins (napins) extraction yield (Y_p in %) was calculated by the suitable eq. 4:

$$Y_p (\%) = \frac{V_e(P)}{m_{meal} x_h x_p x_N} \times 100 \quad (4)$$

where V_e is the extract volume (L), m_{meal} the amount of meal used (g), x_h is the meal moisture fraction (0.92), x_p is proteins fraction in meal (0.38) and x_N is the napins fraction (0.35) in total proteins.

2.4. Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was performed according to Leammli procedure (Leammli, U.K., 1970). Migration and stacking gels contained 15 % and 10 % of polyacrylamide, respectively. Each sample was prepared at around 1 g.L⁻¹ of protein in a solution of bromophenol in non-reducing conditions. The mixture was heated at 100 °C for 5 min. After migration, the gel was coloured with a solution of Comassie blue R 250. A standard molecular weight kit (Bio-Rad Precision Plus Protein Standards) from 250 kDa to 10 kDa was used to determine the molecular weights of rapeseed meal protein extracts.

2.5. Polyphenols/proteins association

The extracts were adjusted at an ammonium sulphate saturation of 70 % during 30 min at room temperature and centrifuged at 13,000 g for 30 min at room temperature. Pellets were then solubilised in an appropriate volume of deionized water to obtain a final protein concentrations of 1.7 g.L⁻¹. Then, solubilized proteins were purified by size-exclusion chromatography (SEC) onto a G-25 column (10 x 11 cm). The sample volume represented 12 % of the column bed volume (corresponding to 30 mg of protein). The elution was achieved using an AKTA purifier system (GE Healthcare Life-Science, Orsay, France) at 40 mL.min⁻¹

¹with deionized water. The fraction of proteins (corresponding to the column dead volume) was collected, spray-dried and then analyzed by RP-HPLC (Shimadzu System, Noisiel, France) with a C₄ Prosphere column (250 mm x 2.1 mm, Alltech, USA). 10 µL of purified napins at 15 g.L⁻¹ were filtered on a 0.22 µm membrane before injection. Analyses were performed at 30 °C with a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹. The elution was carried out using a constant gradient within 80 min from 0 % to 100 % H₂O/ACN/TFA (5/95/0.5 – v/v/v). The absorbance of napins and polyphenols was monitored at 280 nm and 325 nm respectively. The proteins/polyphenols association was evaluated as the ratio of the integrated signal at A₂₈₀ over the one at A₃₂₅ (Fig. 1).

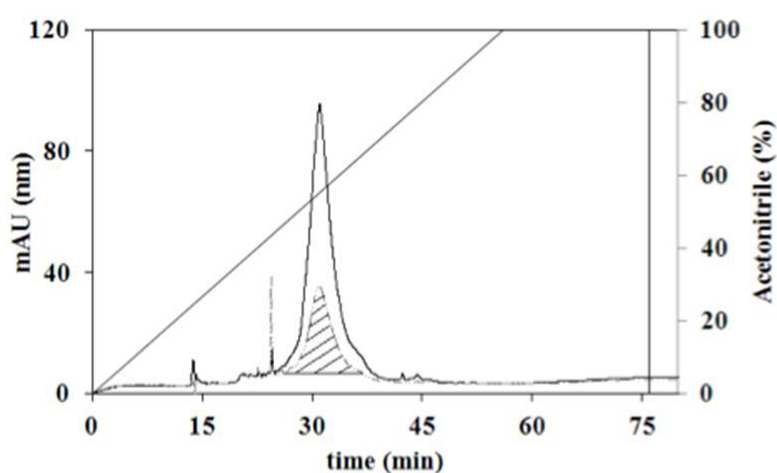


Figure 1. RP-HPLC chromatogram of napins extracted at pH 2, at meal concentration of 13 %, at 57 °C during 15 min. Analysis was performed at 280 nm (black line) and 325 nm (dotted line) to detect napins and phenols respectively. Ratio of integrated signal at 280 nm ($A_{280\text{ nm}}$) over the signal at 325 nm ($A_{325\text{ nm}}$) represented proteins/polyphenols association.

2.6. Circular dichroism (CD) assessment

The structure of napins extracted in optimal conditions and purified (as described above) was studied with the aid of a JCD6 dichrograph (JobinYvon, Longjumeau, France). The secondary structure was analysed in far-UV region (190-250 nm) and the tertiary one in near-UV region (250-300 nm). 1 mm and 10 mm path length quartz cells were used in far and near UV regions, respectively. The concentration of napins was 0.15 g.L⁻¹ for far UV and 1.5 g.L⁻¹ for near UV. Each spectrum was the average of three successive scans. Buffer scans, recorded under identical conditions, were subtracted from the napins spectra.

2.7. Experimental design

A Face-Centered Central Composite design (FCCC) was used with four variables and five replicates at the centre point, for a total of 29 experiments. The variables chosen were the pH (X_1), the meal concentration (X_2), the temperature (X_3) and the reaction duration (X_4). The levels used for each independent variable are shown in Table 1. The napins concentration (Y_1), the napins purity (Y_2), the protein yield (Y_3), the amount of used HCl (Y_4) and the quantity of associated polyphenols (Y_5) were evaluated and considered as output variables (Table 1). The range for each independent variable was determined according to the results of preliminary study [4].

Table 1. FCCC design: variables (four factors) and their three levels of value, used for the optimization of the extraction process of napins from an industrial rapeseed meal.

Factors	Level		
	Low (-1)	Centre (0)	Hight (+1)
pH	2	3	4
Meal concentration (% w/w)	3	9	15
Temperature (°C)	25	45	65
Durationtimes (min)	10	15	20

A second-degree model (eq. 5) was fitted using the partial least square (PLS) method available in the software Modde 7 (UMETRIC AB):

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ j < i}}^n a_{ij} X_i X_j \quad (5)$$

where Y is the value of response; a_0 , a_i , a_{ij} are the coefficients of the model; n is the number of factors and $X_i X_j$ describes the interaction effects between factors. The replicates at the centre point make it possible to estimate the pure error of the responses. The R^2 and the Lack-of-Fit value of the model were calculated for the model reliability evaluation. R^2 is the percentage of the variation of the response expressed by the model. The Lack-of-Fit gives an estimation of the goodness of the structure of the model. For a model to be acceptable, the Lack-of-Fit value should be higher than 0.05^[20]. The fitted model was considered adequate if the Fisher test was significant (p -value < 0.05).

2.8. Multicriteria optimization methodology

The response surface methodology (RSM) is based on efficient experimental designs to model each response and then optimize separately each criterion involved in the problem. However, when criteria are antagonist, optima are associated to different operating conditions. In this case, a compromised solution between responses needs to be defined. A responses multidimensional space, called “Pareto optimal front”, is identified by a genetic-evolutionary algorithm to determine all trade-off solutions (non-dominated solutions) between criteria. The principle of the genetic-evolutionary algorithm used is precisely described in Perrin et al. (1997) ^[19] and is resumed below. The first step is to build a large random set of operating conditions (population of the first generation). For each operating condition (individual), the corresponding criteria set is then evaluated. By comparing each pair of criteria set, a domination index is determined for each operating condition. That domination index expresses the number of times one criteria set is dominated, according to Pareto, by other criteria sets. The population is then sorted and the most dominated individuals are replaced by better (less dominated) individual using suitable cross-over or mutation operators. This sequence is repeated until the whole population consists in only non-dominated individuals, i.e. operating conditions depict the Pareto's domain.

The selection of most appropriate operating conditions from the Pareto's zone was established using the “Decision engineering”. In a first step, several small subsets of the Pareto's front were selected and proposed to the decision-maker for sorting. The ranking was then analysed using “rough sets” theory ^[21]. Rough sets represent a mathematical tool for dealing with inexact, uncertain or vague knowledge. The methodology is based on the premise that lowering the degree of precision in the data makes data pattern more visible, whereas the central premise of theory is that the knowledge consists in the ability of results classification or decisions rules ^[22]. In our case, for each extracted subset, a series of preference and non-preference rules was identified. The identified classification rules were applied to the whole Pareto's front. This approach allows to reduce slightly the number of possible and acceptable solutions in highlighting the preferred trade-offs in the first quintile of the Pareto's front. Thereby the decision maker contributes only at the end of the methodology but determines the best performance trade-off according to his choice.

3. Results and Discussion

3.1. Modelling of the selective napins extraction using a FCCC design

The objectives are to take into account and to model the multiple influence of the four process variables on the performance of the extraction of napins from an industrial rapeseed meal. This explains why the simultaneous effect of pH (2 to 4), solid-liquid ratio (3 % to 15 %), temperature (25°C to 65 °C) and extraction duration (10 min to 20 min) were studied on the napins concentration in the extract, purity (based on dry matter and napins-polyphenols association) and extraction yield. The amount of acid used during extraction was also evaluated in order to consider an economical aspect of the process. The range of the extraction process variables were defined from previously published data^[4].

Table 1 summarizes the design matrix and the results obtained for each experience corresponding to one set of operating conditions (four factors). This table shows that A_{280}/A_{325} values (1.3 ± 0.2 and 1.4 ± 0.3 for repetitions) are very close whatever extraction conditions. It was concluded that the extraction conditions did not have impact napins-polyphenols association. Therefore, this criterion was not selected for modelling.

Table 2. Experimental design with the respective and their response function on napin extraction process.

Run		Factors				Responses				
No	pH (X_1)	meal concentration (%) (X_2)	T ° C (X_3)	duration(min) (X_4)	Napins(g/L) (Y_1)	purity(%) (Y_2)	Yield (%) (Y_3)	5MHC1(mL) (Y_4)	A_{280}/A_{325} (Y_5)	
1	2	15	65	10	2.68	7.68	9.25	10	1.16	
2	3	9	45	15	1.16	6.24	8.33	6.15	1.66	
3	2	3	25	10	0.07	1.17	1.76	3.65	1.68	
4	2	15	25	10	1.48	5.16	5.13	9	1.68	
5	3	9	45	15	1.15	6.34	8.28	6.3	1.14	
6	3	9	25	15	0.44	2.47	3.18	3.75	1.38	
7	2	15	65	20	2.27	7.35	7.86	8.2	1.18	
8	2	3	65	10	0.25	4.16	6.01	4.1	1.06	
9	4	3	25	10	0.0	0.0	0.0	1.1	1.05	
10	2	15	25	20	2.08	7.54	7.19	14.3	1.39	
11	3	9	45	15	1.14	5.72	8.23	6.05	1.16	
12	2	3	65	20	0.28	6.22	6.79	3.3	1.43	
13	2	9	45	15	1.27	7.05	9.18	9.8	1.24	
14	3	9	45	10	0.80	4.37	5.73	7.95	1.51	
15	4	9	45	15	0.64	3.76	4.61	2.25	1.11	
16	3	9	45	15	1.10	5.91	7.89	5.75	1.18	
17	3	9	45	20	1.10	6.32	7.92	5.3	1.06	
18	3	9	65	15	0.98	5.47	7.03	4.45	1.08	
19	4	3	25	20	0.07	1.41	1.76	2.85	1.08	
20	4	3	65	10	0.10	1.87	2.39	0.6	1.33	
21	4	3	65	20	0.15	2.42	3.71	2.25	1.28	
22	2	3	25	20	0.27	4.59	6.50	8.06	1.35	
23	3	9	45	15	1.03	5.61	7.44	8.8	1.64	
24	4	15	65	10	1.61	4.96	4.84	2.45	1.32	
25	4	15	25	10	1.40	5.55	5.56	3.05	1.52	
26	3	15	45	15	1.92	6.26	6.64	10.7	1.40	
27	3	3	45	15	0.09	2.85	2.25	3.85	1.48	
28	4	15	25	20	1.64	6.29	5.66	3.6	1.07	
29	4	15	65	20	1.30	4.26	4.50	3.75	1.05	

From the experiments, the other responses, Y_1 , Y_2 , Y_3 and Y_4 , could be used to identify the coefficients of a polynomial model. The coefficients of determination (R^2) were 0.93, 0.90, 0.88 and 0.89 for Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 respectively, which suggested that this kind of black box model was appropriate to represent the real relationships among the chosen parameters. The adjusted statistic coefficients R^2_{adj} (used to compensate the addition of variables to the model) were 0.93 for Y_1 , 0.85 for Y_2 and 0.81 for Y_3 and 0.85 for Y_4 . The validity of the models and statistical significance of the terms was evaluated by ANOVA (ANalysis Of VAriance). The coefficients with a p-value less than 0.05 are significant at a 95 % confidence level and kept in the model (Table 3). However, for a few coefficients (X_3 , and $X_3 * X_4$, Table 3) the p-values are slightly greater than 0.05. Nevertheless, the corresponding parameter (X_3 : temperature) was kept because it is well known that temperature improve amount of proteins extracted and time reaction rate^[23].

Finally, the lack-of-fit and p-value estimated from ANOVA were less than 0.05 for all responses modelled (Table 4) thus confirming the fitness of the model.

Table 3. Regression coefficients with probability value (p-value) for the second order response surface models considering napins extract concentration, purity, extraction yield and HCl addition.

Responses	Term	Coeff. SC	p-value
Napins concentration	Constant	0.98	0.000
	X_1	-0.207	0.000
	X_2	0.839	0.000
	X_3	0.096	0.054
	$X_1 * X_2$	-0.126	0.019
	$X_1 * X_3$	-0.121	0.025
Purity	Constant	5.490	0.000
	X_1	-1.130	0.000
	X_2	1.68	0.000
	X_3	0.560	0.006
	X_4	0.630	0.003
	$X_3 * X_3$	-1.130	0.001
	$X_1 * X_3$	-0.418	0.046
	$X_2 * X_3$	-0.487	0.022
Extraction yield	Constant	0.382	0.000
	X_1	0.075	0.000
	X_2	-0.100	0.000
	X_3	-0.062	0.000
	X_4	-0.045	0.003
	$X_2 * X_2$	0.125	0.000
	$X_1 * X_2$	-0.042	0.007
	$X_2 * X_3$	0.053	0.001
	$X_2 * X_4$	0.044	0.005
	$X_3 * X_4$	0.034	0.024
	Constant	15.65	0.000
HCl addition	X_1	-0.207	0.000
	X_2	0.143	0.000
	X_3	-0.039	0.020
	X_4	0.055	0.030
	$X_3 * X_3$	-0.145	0.001

Table 4. ANalysis Of VAriance (ANOVA) for the second order response surface model of napins extract concentration, purity, extraction yield and HCl addition.

Responses	Source of variation	DF	SS	MS	Fv	Pv	SD
Napinsconcentration	Total corrected	28	15.05	0.53			0.73
	Regression	14	14.35	1.02	20	0	1.01
	Residual	14	0.70	0.05			0.22
	Lack of fit	10	0.69	0.07	25	0.003	0.26
	Pure error	4	0.010	0.003			0.05
Purity	Total corrected	28	15.05	0.53			0.73
	Regression	14	14.35	1.02	20	0	1.01
	Residual	14	0.70	0.05			0.22
	Lack of fit	10	0.69	0.07	25	0.003	0.26
	Pure error	4	0.010	0.003			0.05
Extractionyield	Total corrected	28	169.32	6.04			2.45
	Regression	14	143.04	10.21	5.44	0.002	3.19
	Residual	14	26.28	1.87			1.37
	Lack of fit	10	25.72	2.57	18.41	0.006	1.60
	Pure error	4	0.56	0.14			0.37
HCladdition	Total corrected	29	1.65	0.05			0.24
	Regression	5	1.41	0.28	27.79	0.000	0.53
	Residual	23	0.23	0.01			0.10
	Lack of fit	19	0.21	0.01	2.31	0.21	0.10
	Pure error	4	0.019	0.004			0.07

DF: degreesoffreedom; SS: sum of squares; MS: meansquare; Fv: Fishervalue; Pv: p-value; SD: standard deviation;

The final response regression equations (eq. 6, 7, 8 and 9) obtained, considering only statistically significant coefficients, were developed for all responses:

$$Y_1 = -0.98 - 0.21X_1 + 0.84X_2 + 0.01X_3 - 0.13X_1X_2 - 0.12X_1X_3 \quad (6)$$

$$Y_2 = 5.49 - 1.13X_1 + 1.68X_2 + 0.56X_3 + 0.63X_4 - 1.13X_3X_3 - 0.42X_1X_3 - 0.48X_2X_3 - 0.39X_3X_4 \quad (7)$$

$$y_3 = 0.382 + 0.07X_1 - 0.100X_2 - 0.062X_3 - 0.045X_4 + 0.12X_2X_2 - 0.04X_1X_2 + 0.053X_2X_3 + 0.04X_2X_4 + 0.034X_3X_4 \quad (8)$$

$$y_4 = 15.65 - 0.20X_1 + 0.14X_2 - 0.039X_3 + 0.05X_4 - 0.14X_3X_3 \quad (9)$$

According to the significant model terms, for all equations, pH and concentration of meal have the most important effect on all criteria (quantity of napins in the extract, purity of napins, extraction yield and amount of acid used). Furthermore, it can be noted that the temperature also influences significantly these criteria, confirming that it was appropriate to preserve this parameter for the optimization of extraction. The extraction duration has the slightest impact on the extraction performance. Obviously, this parameter affected only the amount of acid used to keep the pH during extraction. The model developed for each criterion was then used to multicriteria optimization by decision engineering.

3.2. Conditions for optimal responses: multicriteria optimization by decision engineering

To evaluate the better extraction conditions, the Pareto's domain (representation on factors space) was identified using a genético-evolutionary algorithm with 5000 individuals, as previously described (section 2.8). The Pareto's domain is shown in figure 2. Our model includes four factors, so the representation of the Pareto's domain was complicated. This explains why the results are presented using a projection of the most influential factors (pH, temperature and meal concentration) on a three-dimension space. For all the points, the extraction duration is higher than 11 min.

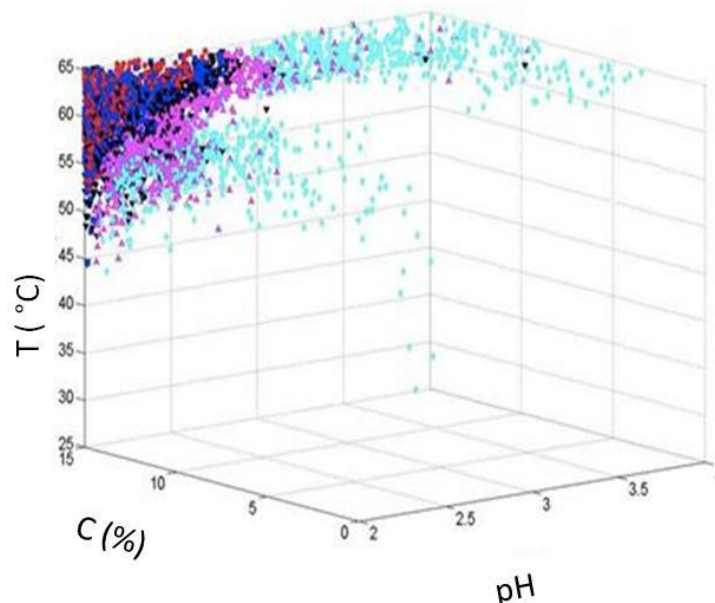


Figure 2. Representation of the Pareto's domain in a simplified 3-dimension space when the extraction duration was higher than 11 min. Each point corresponds to an experimental conditions set (potential solution when extraction duration of 11 min). The 1000 best points are represented in blue, points ranking between 1001-2000 in red, points ranking between 2001-3000 in black, points ranking between 3001-4000 in violet and points ranking between 4001-5000, the less accurate solution sets, in light blue.

In that zone, we can identify 5000 non-dominated (acceptable) solutions that were used for decision engineering. The decision maker has chosen and ranked 3 sets of five points in the Pareto's front, allowing to identify its preference according to preference and non-preference rules. Then this was applied to organize, into a hierarchical way, all the points of the Pareto's front. This classification method is known as “rough set theory” [21]. Figure 2 allows to visualize the five different distribution points areas from blue squares to light blue squares:

- 1st area (bleu zone): between 1- 1000 (20 %),
- 2nd area (red zone): between 1001- 2000 (40 %),
- 3rd area (black zone): between 2001- 3000 (60 %),
- 4th area (violet zone): between 3001- 4000 (80 %),
- 5th area (light blue zone): between 4001- 5000 (100 %).

The preferred trade-off solutions (20 %) are located in the blue area. This distribution permitted to distinguish all possible experimental conditions to apply according to the (multi) objectives that we would expect. Moreover, this classification allowed to simplify the optimum experimental conditions choice by reducing numbers of trade-off solutions. In a last step, in order to point out the final trade-off solutions among 1000 points, the barycentre of the Pareto's zone was determined to define the trade-off experimental conditions. At the end of the applied methodology, the intervention of the decision maker is fundamental to introduce its preferences. The choice of the best trade-off solutions was not based on *a priori* preference of one criterion value over another one. The best trade-off conditions were 2 for pH (X_1), 13 % (w/w) for meal concentration (X_2), 57 °C for temperature (X_3) and 15 min for extraction duration (X_4). As we can be seen in Fig. 3, the extraction at pH 2 is a guarantee of selective extraction. Water/meal ratio of 13 % is the best trade-off to ensure a favourable napins concentration and extraction yield. A temperature of 57 °C is a suitable choice for both high napins recovery and economic reasons. An extraction duration of 15 min make sure that the maximum napins extraction is performed. These operating conditions led to the best process performances (selectivity, protein concentration and extraction yield) by using the lowest acid amount (9 mL of HCl 5 N).

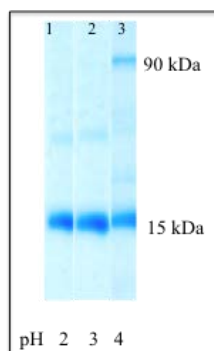


Figure 3. Effect of pH on napins selective extraction. Extractions were performed at pH 2,3 and 4 at meal concentration of 15 %, 65 °C and during 20 min (extreme level parameters of extraction conditions of experimental design) SDS-PAGE 15 % patterns, in non-reducing conditions. Protein concentration was 2 g.L⁻¹. A single bande of 15 kDa was observed at pH 2 and 3. A pH 4 were observed two band at 90 kDa and 15 kDa indicating that this pH is not guaranty of selective extraction.

The predicted responses were compared to experimental ones (Table 5). As can be seen Table 5, experimental and calculated values are very close which tends to validate the methodology.

Table 5. Results of predicted and experimental responses at optimal condition.

	Napins concentration (g.L ⁻¹)	Napins purity (%)	Extraction Yield (%)	HCl (5N) amount (mL)
Predicted results	2.1	8.2	9.9	8.6
Observed results	2.5±0.5	9.8±0.65	11±0.40	8.8±0.21

3.3 Structural analysis of napins extracted at optimal condition

The purity of napins extracted in optimal conditions were analysed by SDS-PAGE (Fig. 4) and by CD analysis (Fig. 5 A and B). Electrophoresis shows a single band at around 15 kDa, which corresponds to napins molecular weight (Fig. 4), confirming the good selectivity of extraction step. The near UV spectra (Fig. 5 A) show three minima at around 295, 270 and 265 nm and maxima at 290 and 255 nm. Interestingly, the profile is similar to the native napins spectra from *B. juncea* reported in the literature [24]. This tends to indicate that the extraction process implemented at optimal conditions not affected napins tertiary structure. The secondary structure was explored in far UV region (185-200 nm) (Figure 5 B). Two minima at 222 and 208 nm are observed indicating the predominance of α -helix structure. A very similar shape was already observed with native napins from Rapeseed^[4,24]. Therefore, the

assumption that extraction conditions process proposed not affect napins from an industrial meal, appeared to be reinforced.

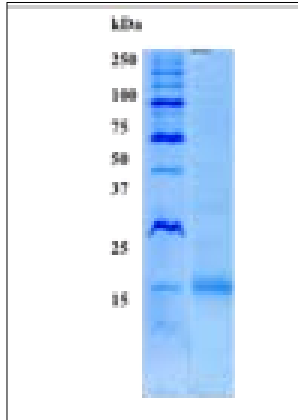


Figure 4. SDS-PAGE 15 % of napins extracted at optimal condition (pH 2, 13 % of meal, 57 °C during 15 min) and purified by salting-out method with ammonium sulphate saturation of 70 % and by SEC onto G-25 column. The SDS-PAGE shows a single band at around 15 kDa, indicating a good selectivity of extraction at optimal condition.

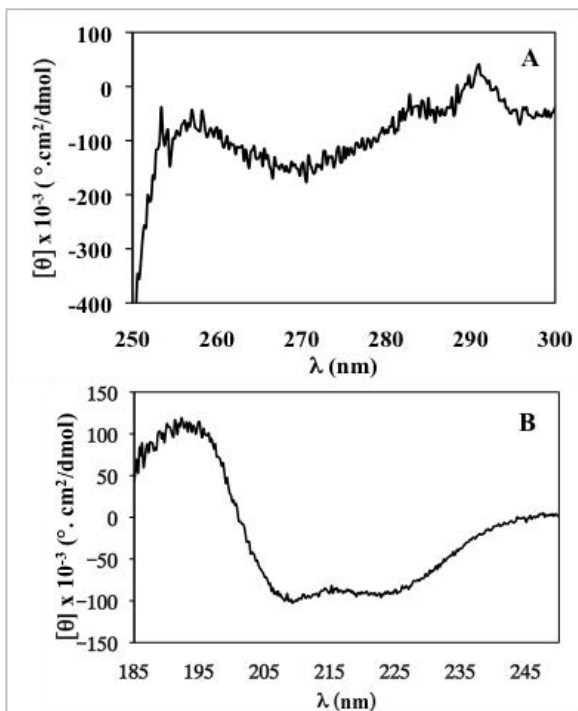


Figure 5. (A) CD spectra on near UV region (250-300 nm) and (B) far UV region (185-200 nm) of napins extracted at optimum conditions. Scan was recorded using a cell with 10 and 1-mm path length for near and far UV respectively.

4. Conclusion

This study presents an original methodology to improve an extraction process of an antimicrobial protein from an agro-bioresource by-product. A FCCC experimental design was applied in order to evaluate the combined effect between the main factors that impact selective napins extraction. In order to optimize extraction process performances concerning

the concentration of napins selectively extracted, purity, extraction yield, while reduce process cost regarding the acid amount used, a multicriteria optimization procedure by decision engineering procedure was applied. The best trade-off between solutions was obtained at this optimal condition: pH = 2, 13 % of meal concentration (g of meal/g of deionized water), 57 °C during 15 min. Indeed, in these conditions we obtained highest napins quantity selectively extracted by using weakest acid amount. Because of short extraction duration and reduced consumption of organic solvent, the proposed process appeared to be interesting for industrial applications as far as costs and ecological consideration are concerned. Moreover, the effective extraction parameters have not affected the napins structure, which is essential for maintaining its biological potential.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Alexandre Kriznik and Sophie Rahuel from the “Service commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires (SCBIM of Université de Lorraine)” for the use of JCD6 discograph instruments.

References

- [1] Sandiford CP, Tatham AS, Fido R, Welch JA, Jones MG, Tee RD, Shewry PR, Taylor A JN. Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 1997; 27 (10): 1120–1129.
- [2] Shewry PR, Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot* 2002; 53 (370): 947–958.
- [3] Friedman M, Brandon DL. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. *J Agr Food Chem* 2001; 49 (3): 1069–1086.
- [4] Nioi C, Kapel R, Rondags E, Marc I. Selective extraction, structural characterisation and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal. *Food Chem* 2012; 134 (4): 2149–2155.
- [5] Duranti M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 2006; 77 (2): 67–82.
- [6] Moure A, Sineiro J, Dominguez H, Parajò JC. Functionality of oilseed protein products: A review. *F Res Int* 2006; 39 (9): 945–963.
- [7] Arifin B, Bono A, Farm YY, Ling ALL, Fui SY. Protein Extraction from Palm Kernel Meal. *J Appl Sci* 2009;9(17): 2996–3004.
- [8] Delgado-Moreno PA, Mingorance MD. Design of experiments in environmental chemistry studies: example of the extraction of triazines from soil after olive cake amendment. *J Hazard Mater* 2009; 162(2-3): 1121–1128.
- [9] Aider M, Barba C. Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - A practical and critical review. *Trends Food Sci Tech* 2011; 22 (1): 21–39.

- [10] Rodrigues I, Coelho J, Carvalho M. Isolation and valorisation of vegetable proteins from oil seed plants: methods, limitations and potential. *J Food Eng* 2011; 109 (3): 337–346.
- [11] Pickardt C, Neidhart S, Griesbach C, Dube M, Knauf U, Kammerer DR, Carle R. Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal. *Food Hydrocolloid* 2009; 23 (7), 1966–1973.
- [12] Firatligil-Durmus E, Evranuz O. Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*) *Food Sci Technol* 2010; 43 (2): 226–231.
- [13] Viennet R, Fonteix C, Marc I. New multicriteria optimization method based on the use of a diploid genetic algorithm: Example of an industrial problem. *Artif Evol* 1996; 1063: 120–127.
- [14] Geoffrion AM, Dyer JS, Feinberg A. An Interactive Approach for Multi-Criterion Optimization, with an Application to the Operation of an Academic Department. *Manage Sci* 1972; 19 (4-Part-1): 357–368.
- [15] Chabanon G, Chevalot I, Framboisier X, Chenu S, Marc I. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochem* 2007; 42 (10): 1419–1428.
- [16] Neumann GM, Condron R, Thomas I, Polya GM. Purification and sequencing of multiple forms of Brassicanapus seed napin small chains that are calmodulin antagonists and substrates for plant calcium-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1295 (1): 23–33.
- [17] Monsalve RI, Villalba M, López-Otín C, Rodríguez R. Structural analysis of the small chain of the 2S albumin, napin III, from rapeseed. Chemical and spectroscopic evidence of an intramolecular bond formation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1078 (2): 265–272.
- [18] Muniglia L, Nandor Kiss L, Fonteix C, Marc I. Multicriteria optimization of a single-cell oil production. *Eur J Oper Res* 2004; 153 (2): 360–369.
- [19] Perrin E, Mandrille A, Oumoun M, Fonteix C, Marc I. Optimisation globale par stratégie d'évolution : Technique utilisant la génétique des individus diploïdes. *RAIRO. Oper res* 1997 ;31(2): 161–201.
- [20] Carlson R. Design of Experiments, Principles and Applications. *J Chemom* 2001 ;15(5) : 495–496.
- [21] Pawlak Z. Rough set theory and its applications to data analysis. *Cybern Syst* 1998; 29 (7): 661–688.
- [22] Huang CC, Liang WY, Lin SH, Tseng TL, Chiang HY. A rough set based approach to patent development with the consideration of resource allocation. *Expert Syst Appl* 2011; 38 (3): 1980–1992.
- [23] Shen L, Wang X, Wang Z, Wu Y, Chen J. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food chem* 2008; 107 (2): 929–938.
- [24] Jyothi TC, Sinha S, Singh SA, Surolia A, Appu Rao AG. Napin from *Brassica juncea*: Thermodynamic and structural analysis of stability. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1774 (7): 907–919.

3.2. Contributions de l'article

Grâce à l'application de la méthodologie de surface de réponse (MSR) couplée aux outils du génie décisionnel, cette étude a permis d'évaluer l'effet conjugué de quatre facteurs (pH, concentration en tourteau, température et durée d'extraction) sur les performances du procédé d'extraction sélective des napines. Cinq critères ont été pris en compte : la concentration en napines extraites, la pureté, le rendement du procédé, l'association polyphénols/napines et la quantité d'acide ajouté pour l'extraction. Une condition d'extraction à pH 2, avec une concentration en tourteau de 13 % pendant une durée courte (15 mn) et une température raisonnable (57 °C), représente le meilleur compromis pour optimiser l'ensemble des critères. Par ailleurs, le procédé mis en place n'influence pas la structure de la protéine, qui, comme montré dans la première partie de ce chapitre, est très importante pour l'expression de sa bioactivité.

4. EXTRACTION ET PURIFICATION DES NAPINES A L'ECHELLE PILOTE

L'étude présentée dans le paragraphe précédent a permis de définir les conditions opératoires optimales du procédé d'extraction sélectif des napines. Afin de poursuivre le déroulement de notre travail, notamment l'étude concernant la mise en œuvre de la protéolyse, il a été nécessaire de produire une réserve de protéines d'environ 50 g. Pour cela, le procédé d'extraction-purification a été extrapolé à l'échelle pilote de laboratoire. L'extraction a été réalisée en réacteur de 5 L et la purification par combinaison de deux techniques : l'ultrafiltration et la chromatographie d'exclusion de taille. L'étape de filtration membranaire vise à remplacer la phase de pré-purification par précipitation au sulfate d'ammonium, utilisée à petite échelle. En effet, cette technique présente l'inconvénient majeur d'utiliser une quantité de sels importante, ce qui rendrait le procédé très coûteux lors de son extrapolation à grande échelle. C'est pourquoi une partie de nos travaux a été consacrée à la mise en œuvre d'un procédé de purification par ultrafiltration. Dans ce cadre, les conditions opératoires seront définies suivant les critères de pureté et de rendement en protéine. Dans une seconde étape, la composition chimique et la qualité des napines purifiées sont déterminées respectivement par chromatographie en phase inverse (CLHP-PI) et par dichroïsme circulaire (DC). Une analyse comparative entre les deux procédés de purification (petite et grande échelle) sera conduite afin d'évaluer leur efficacité.

4.1. Mise en œuvre du procédé de purification des napines par techniques membranaires

Le procédé de purification des napines à l'échelle pilote, comme celui à petite échelle, est constitué par une étape de clarification, une de concentration et une dernière de dessalage. L'étape de clarification, précédemment réalisée par filtration frontale est substituée par une étape de microfiltration. Au cours de cette étape, la pureté de l'extrait augmente de 8,5 % à 9,6 %. Ce résultat est très satisfaisant et du même ordre de grandeur que celui obtenu par clarification à l'échelle du laboratoire (9,2 %). L'extrait ainsi clarifié est concentré et pré-purifié par ultrafiltration (UF) et diafiltration. Lors de cette étape, une membrane de 3 kDa a été utilisée. Pendant la concentration, les molécules protéiques d'intérêt sont retenues dans le rétentat et la fraction contaminante (glucides et polyphénols) est éliminée dans le perméat. Le rétentat, recyclé dans la cuve d'alimentation, est ainsi concentré et pré-purifié. Le rapport du volume initial d'extrait sur le volume final du rétentat est défini comme étant le facteur de concentration volumique (FCV). Dans un premier temps, l'évolution de la pureté en fonction du facteur de concentration volumique (de 1,5 à 5) est suivie. Le facteur de concentration maximale est de 5 à cause des limites volumiques de l'appareil. La figure 28 montre que le taux de pureté de l'extrait initial augmente de 9,2 % à 27 % après l'étape de concentration (FCV 5). On peut aussi observer, à l'aide de cette figure que le rendement du procédé reste constant. Ceci laisse supposer qu'il n'y a pas de perte de matière protéique tout au long de cette phase.

Une forme de l'ultrafiltration, connue pour améliorer les performances séparatives, est la diafiltration. Dans ce cas, le rétentat concentré est dilué avec un volume d'eau à pH 2 (v/v) et retraité dans le module d'ultrafiltration. L'évolution de la pureté en fonction de plusieurs diavolumes (DV) est alors suivie. La figure 28 montre que, après une diafiltration, la pureté de l'extrait augmente de 27 % à 32 %. Toutefois, pendant les trois diafiltrations successives, la pureté diminue jusqu'à 14 %, ce qui entraîne aussi une chute du rendement du procédé. Un colmatage de la membrane, un passage de la fraction protéique dans le perméat ou une précipitation des napines provoquée par un changement de l'environnement ionique dans le rétentat, sont des hypothèses plausibles.

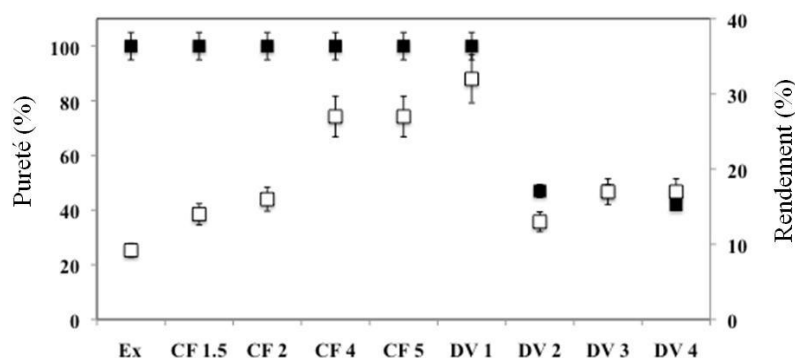


Figure 28. Evolution de la pureté (□) de l'extrait des napines et du rendement du procédé (■) pendant les étapes de concentration et de purification par ultrafiltration.

Le suivi du débit pendant les différentes étapes de concentration et de diafiltration a permis de vérifier la première hypothèse (Figure 29). La figure montre que le débit reste constant ($42 \text{ mL} \cdot \text{mn}^{-1}$) tout au long de l'ultrafiltration ce qui indique qu'il n'y a pas de colmatage de la membrane au cours de cette étape.

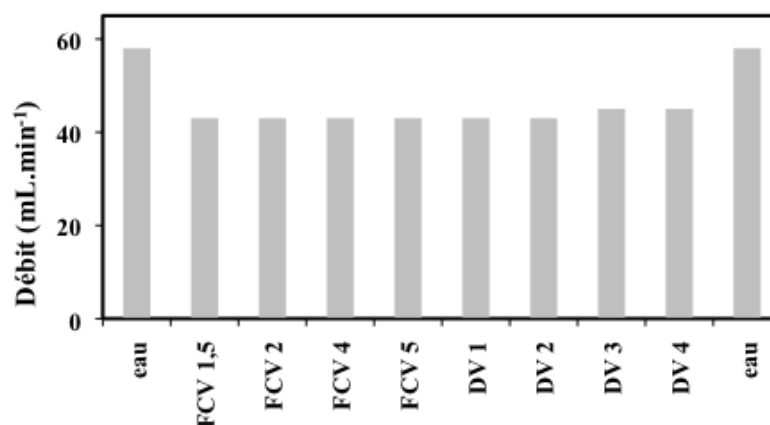


Figure 29. Evolution du débit de filtration au cours de l'ultrafiltration et de la diafiltration.

Une analyse du perméat en SDS-PAGE (figure 30) ne montre pas la présence de napines, ce qui dément aussi la seconde hypothèse. Par contre, l'électrophorèse du rétentat montre une bande d'environ 15 kDa présente dans le rétentat, qui correspond à la taille des napines. Ceci confirme l'absence de passage de la protéine à travers la membrane. La précipitation des napines, suite au changement d'environnement ionique pendant le procédé, reste donc l'hypothèse la plus plausible.

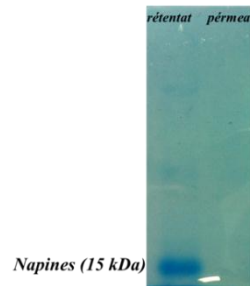


Figure 30. SDS-PAGE 15 % du rétentat et du perméat.

En effet, la présence d'interactions intermoléculaires napine-napine ou d'interactions entre napines et fraction non protéique restant dans le rétentat pourrait favoriser la formation d'une fraction insoluble (Xu et Diosady, 2000 ; Shahidi et Naczki, 1992).

D'après ces résultats, un facteur de concentration volumique de 5 et une diafiltration sont définis comme les conditions opératoires de purification par ultrafiltration les plus performantes en termes de pureté et de rendement. L'extrait ainsi obtenu est dessalé par chromatographie liquide basse pression d'exclusion stérique (CLBP-ES). Lors de cette étape on obtient un produit ayant une pureté de 92 %. Le schéma de la figure 31, résume les étapes des deux procédés à petite et à grande échelles.

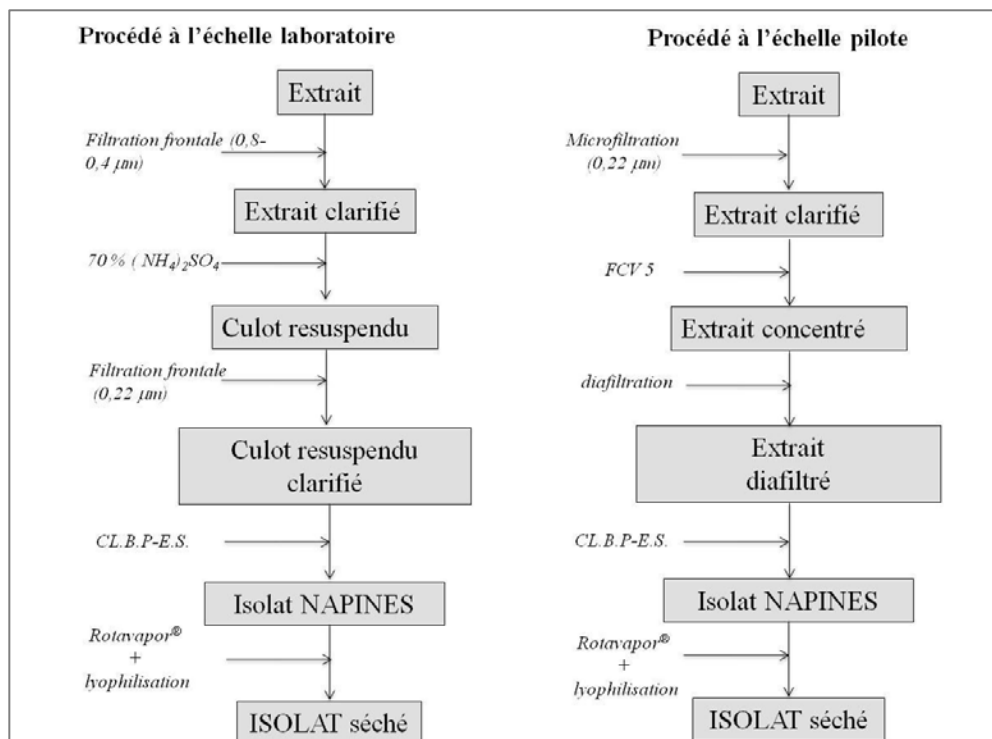


Figure 31. Etapes comparées des procédés d'extraction et purification des napines à l'échelle du laboratoire et à l'échelle semi-pilote.

Les effets de toutes les étapes sur la pureté de l'extrait et le rendement des procédés sont montrés dans le tableau 5 A et B. Il est visible que la pureté de l'extrait augmente de 8,5 % à 29 % après la phase de concentration par précipitation au sulfate d'ammonium (Tableau 5 A). Par contre, la pureté de l'extrait, après l'étape d'ultrafiltration et diafiltration, augmente jusqu'à 32 % (Tableau 5 B). De même, le rendement du procédé par technique membranaire (90 %) est meilleur que celui obtenu après « salting-out » (66 %). Cet écart est probablement dû à la difficulté de la remise en solution des napines dans le culot obtenu après précipitation au $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$. La dernière étape de dessalage est nécessaire, pour les deux procédés afin d'obtenir un isolat des napines (pureté de 92 %). Ainsi, ces résultats montrent donc que l'étape de pré-purification par ultrafiltration est bien adaptée pour la purification de notre extrait. De plus, chaque étape de chromatographie à grande échelle permet de purifier 600 mg de protéines contre 15 mg produits à petite échelle. Par conséquent, le dimensionnement de notre procédé se révèle satisfaisant pour la production du stock de napines envisagé.

Tableau 5. Pureté de l'extrait et rendement du procédé d'extraction/purification à l'échelle laboratoire (A) et l'échelle pilote (B).

A	Echelle laboratoire	Pureté (%)	Rendement (%)
	Extraction S/L	8,5 ± 0,5	100
	Clarification	9,2 ± 0,8	90,2 ± 0,8
	Precipitation au $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$	29 ± 0,6	66 ± 0,6
	CLBP-ES	92 ± 1,2	66 ± 1,2
B	Echelle pilote	Pureté (%)	Rendement (%)
	extraction S/L	6,6 ± 0,5	100
	Clarification	5,9 ± 1,2	89,4 ± 1,2
	UF (FCV 5)+1 DV	32 ± 1,5	90 ± 1,5
	CLBP-ES	92 ± 1,2	90 ± 1,2

4.2. Analyse qualitative comparative des napines extraites à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote

La seconde partie de cette étude vise à analyser qualitativement l'extrait obtenu pendant la purification à grande échelle. Pour cela, la présence des phénols a été suivie tout au long de la phase de pré-purification et une analyse structurale du produit obtenu a été effectuée.

4.2.1. Analyse par CLHP-PI des napines purifiées par techniques membranaires

L'extrait obtenu à chaque étape de purification a été analysé par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP-PI) (Figure 32) afin de suivre l'évolution des composés polyphénoliques. Les profils obtenus sont comparés à l'extrait obtenu par purification à l'échelle du laboratoire. L'éluion de la composante polyphénolique est suivie à 325 nm. D'après la figure 32, il apparaît que l'étape de purification par ultrafiltration permet une meilleure élimination de la fraction polyphénolique par rapport à la précipitation au sulfate d'ammonium. Ceci est en accord avec les valeurs de pureté obtenues auparavant et confirme l'efficacité de l'étape de pré-purification par les techniques membranaires.

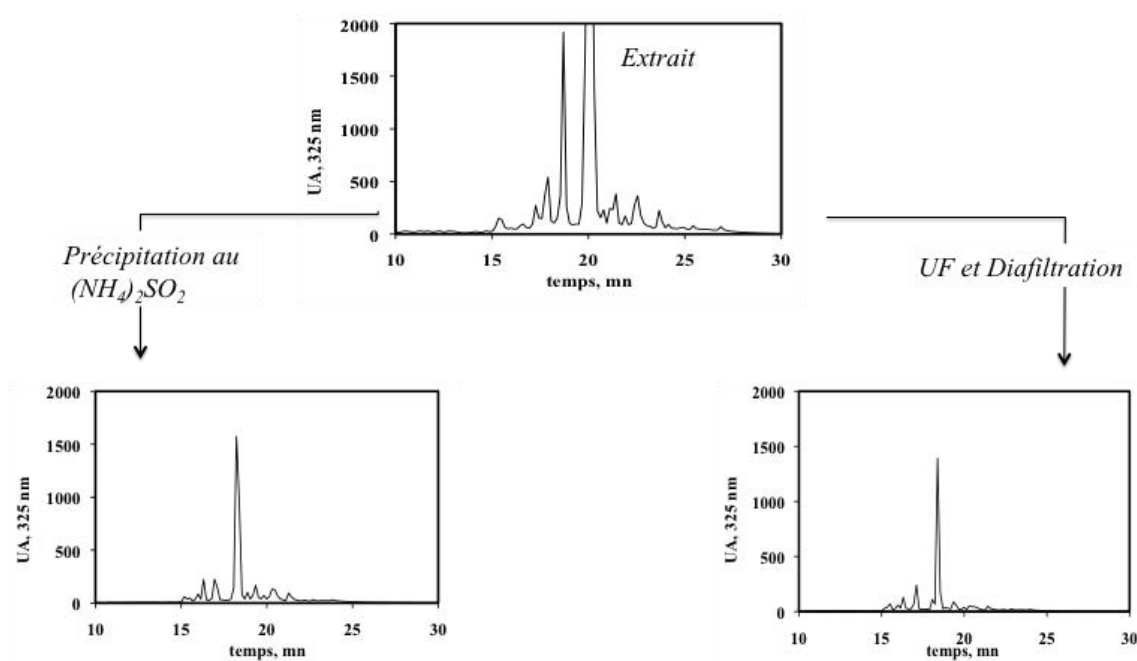


Figure 32. Profils en CLHP-PI (colonne C₄) de l'extrait des napines pendant les étapes de purification par précipitation au sulfate d'ammonium et par ultrafiltration (FCV 5 et 1 DV).

4.2.2. Analyse structurale des napines purifiées par techniques membranaires

L'extrait purifié par ultrafiltration et CLHP-ES a été analysé par dichroïsme circulaire, afin d'évaluer l'influence du procédé sur la structure des napines obtenues. Dans la première partie de ce chapitre, il a été montré que le procédé d'extraction/purification à petite échelle n'affectait pas la structure des napines, ni leur pouvoir biologique. C'est pourquoi leur structure a été comparée à celle des napines issues de la purification par ultrafiltration. Les figures 33 A et 33 B montrent respectivement les spectres des napines dans le lointain (185-

250 nm) et le proche UV (250-320 nm). Les spectres, dans le lointain UV, de la protéine issue des deux procédés de purification se superposent parfaitement.

Ceci indique que la purification par ultrafiltration n'affecte pas, non plus, la structure secondaire des napines. De même, les profils dans le proche UV sont équivalents quel que soit le procédé appliqué. Ainsi, la structure tertiaire est aussi préservée. Ces résultats confirment la validation du procédé de purification à plus grande échelle.

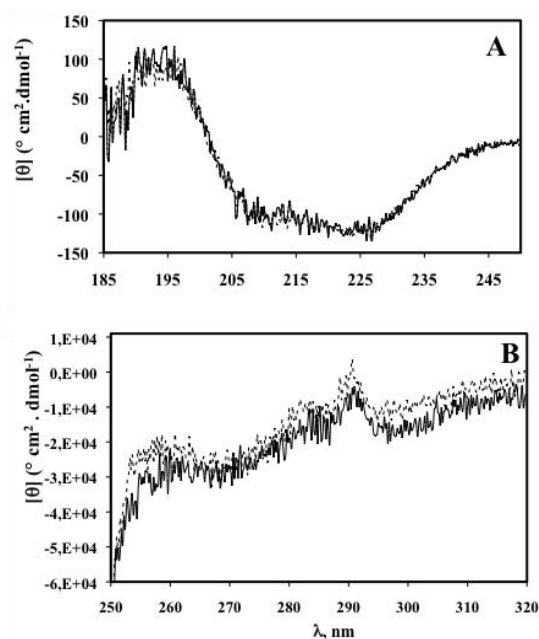


Figure 33. Spectres dans le lointain UV (A) et proche UV (B) des napines purifiées à grande (ligne continue) et à petite échelle (ligne pointillée). Les analyses sont effectuées à température ambiante avec un tampon phosphate 20 mM à pH 7. La protéine a une concentration de $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ et de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ dans le lointain et le proche UV respectivement.

En résumé

L'objectif de cette partie de ce travail a été d'effectuer une étude préliminaire sur le procédé d'extraction de napines issues d'un tourteau de colza industriel. L'effet d'un certain nombre de paramètres et leur niveau d'influence respectif ont été évalués. A partir de là, un plan expérimental a été réalisé pour son optimisation. Les critères quantitatifs pris en compte pour cette étude sont : la quantité de napines extraites sélectivement, leur pureté et le rendement du procédé. Ces critères ont été associés à une analyse qualitative des napines extraites : leur association avec des composés polyphénoliques. Par ailleurs, la quantité d'acide, ajoutée lors de l'extraction, a été prise en compte dans notre modèle. Une optimisation multicritère basée sur le génie décisionnel a ainsi permis de définir la condition d'extraction sélective la plus performante et la plus économique : pH = 2, [tourteau] = 13 % (p/p), T = 57 °C et t = 15 mn. Ces conditions opératoires ont été appliquées pour la production d'un isolat de napines à l'échelle pilote de laboratoire. La séparation par filtration tangentielle s'est révélée un procédé très performant pour l'obtention d'une grande quantité de napines. Il a été mis en évidence que les procédés d'extraction et de purification mis en place ne modifient pas la structure de la protéine. La validation de ses propriétés antifongiques envers *Fusarium langsethiae* suggère leur possible rôle dans la protection contre les pathogènes en tant qu'antifongique. Dès lors, la valorisation des napines se justifie pour leur utilisation dans le cadre de l'étude du procédé de protéolyse.

La figure 34 montre un schéma de la démarche et des principaux résultats de ce chapitre

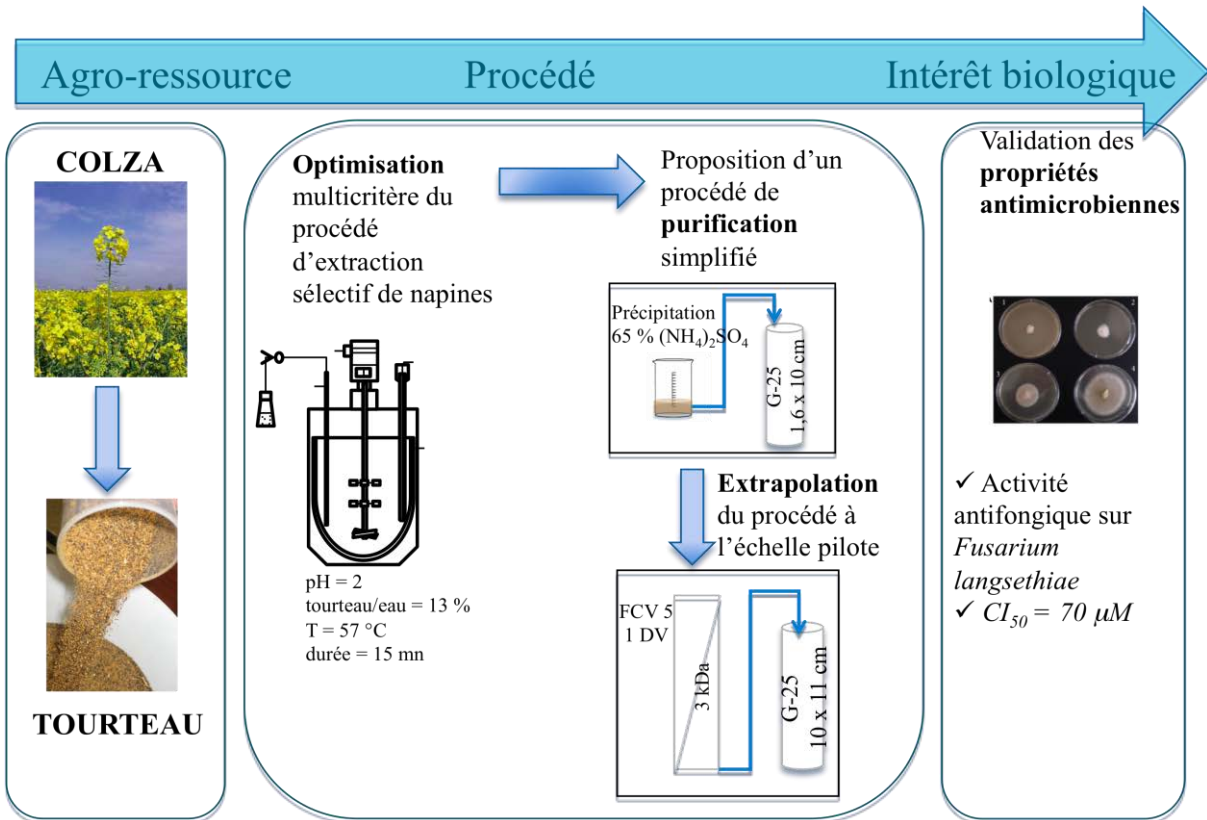


Figure 34. Résumé du chapitre 1. Optimisation d'un procédé d'extraction/purification des napines, protéines à propriétés antimicrobiennes.

Chapitre II

*Influence de l'état structural du substrat sur la
protéolyse enzymatique*

CHAPITRE II : Influence de l'état structural du substrat sur la protéolyse enzymatique

1. INTRODUCTION	147
2. HYDROLYSE DE NAPINES EN CONDITION BASIQUE PAR L'ALCALASE® 2.4L	148
2.1. Effet de l'état structural de napines sur le procédé de protéolyse enzymatique	148
2.2. Manuscrit : Rapeseed napins denaturation by pH, temperature, incubation duration and its effect on the enzymatic proteolysis	148
2.2.1. Contributions de l'article.....	164
2.3. Propriétés biologiques des mélanges obtenus	164
2.3.1. Influence des mélanges obtenus sur la croissance des cellules animales	165
2.3.2. Propriétés antimicrobiennes	169
3. HYDROLYSE DES NAPINES EN CONDITION ACIDE PAR LA PEPSINE.....	170
3.1. Effet de la durée d'incubation sur la cinétique de protéolyse	171
3.2. Effet de la durée d'incubation sur la qualité des mélanges obtenus	174
3.3. Propriétés fonctionnelles des mélanges obtenus	176
3.3.1. Propriétés moussantes	176
3.3.2. Propriétés émulsifiantes	177

1. INTRODUCTION

Actuellement, la protéolyse enzymatique est le procédé privilégié pour la valorisation des protéines, afin d'obtenir des hydrolysats / peptides à haute valeur ajoutée. Toutefois, ce procédé présente des contraintes de maîtrise du fait de la multiplicité des facteurs qui entrent en jeu pour sa mise en œuvre (i.e. pH, T, durée de réaction). Parmi ces paramètres, le pH et la température influencent aussi la structure de la protéine, substrat de la réaction d'hydrolyse. Cet aspect structural est souvent mal maîtrisé. Dans ce contexte, la deuxième partie de ce travail a comme objectif d'identifier les paramètres qui influencent la structure des napines (notre substrat modèle de protéolyse) et comprendre leur mécanisme de dénaturation. Pour cela, l'application de plusieurs techniques d'analyse se révèle nécessaire :

- la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) : pour étudier la stabilité des napines, puisqu'elle permet de déterminer la température de dénaturation des protéines,
- le dichroïsme circulaire (lointain et proche UV) : pour déterminer l'influence du pH sur leurs structures secondaire et tertiaire,
- la fluorescence : pour déterminer la cinétique de dénaturation de la structure tertiaire des napines à un couple de pH/T donné.

Par la suite, les couples de pH/T correspondant à des états structuraux différents seront définis comme conditions opératoires du procédé de protéolyse. A partir de là, des protéases ayant une activité catalytique optimale dans des conditions opératoires différentes seront choisies. Afin d'évaluer l'effet de l'état structural initial de la protéine sur la cinétique de protéolyse et sur la qualité des mélanges obtenus (propriétés physico-chimiques), des procédés de protéolyse des napines, à des taux de dénaturation variés, seront mis en œuvre. La validation des bioactivités des peptides ainsi libérés se fera sur :

- leur capacité de stimuler la croissance des cellules animales productrices d'anticorps,
- leur pouvoir antimicrobien.

Enfin, leur capacité à former et à stabiliser les mousses et les émulsions seront quantifiées.

2. HYDROLYSE DE NAPINES EN CONDITION BASIQUE PAR L'ALCALASE®

2.4L

2.1. Effet de l'état structural de napines sur le procédé de protéolyse enzymatique

Le pH et la température sont les paramètres les plus influents sur la structure des protéines. C'est pourquoi, l'effet simple et couplé de ces deux paramètres a été déterminé par dichroïsme circulaire et calorimétrie différentielle à balayage. Différentes conditions de pH ont été choisies pour évaluer leur impact sur la stabilité de la protéine : pH acide (3), basique (11) et neutre (7). Dans un premier temps, le mécanisme de dénaturation des napines a été étudié. Par la suite, un suivi cinétique de dénaturation pour des couples différents de pH/T a été réalisé, afin de faire émerger la « durée d'incubation » (période de temps pendant laquelle la protéine est stockée dans des conditions définies de pH et de T) comme paramètre de « contrôle » de la dénaturation. L'influence de ce nouveau paramètre pouvant induire une modification structurale de la protéine, sera évaluée en étudiant la cinétique de protéolyse ainsi que la qualité des mélanges obtenus et libérés (propriétés physico-chimiques).

Une partie de ces résultats est présentée sous la forme d'un manuscrit de publication soumis le 11 avril 2013 dans le journal « Innovative Food Science and Emerging Technologies » et qui porte le titre: « Rapeseed napins denaturation by pH, temperature, incubation duration and their effect on the enzymatic proteolysis ».

2.2. Manuscrit : Rapeseed napins denaturation by pH, temperature, incubation duration and its effect on the enzymatic proteolysis

Claudia Nioi, Yann Guiavarc'h, Philippe Arnoux, Ivan Marc, Romain Kapel

Abstract

The thermal stability of napins from an industrial rapeseed meal was investigated by using differential scanning calorimetry (DSC) at pH 3, 7 and 11. The thermal denaturation is well described by an independent multi-state unfolding, with at least two transitions. Napins are more sensitive to heat treatment under basic conditions. A fluorescence study reveals that napins are fully denatured at pH 11 during a treatment of 30 min at 75 °C. Such a heat treatment of napins prior the addition of Alcalase® has a significant effect on proteolysis. This pre-incubation allowed a significant improvement in proteolysis kinetic (increasing of DH by

around 70 %). This treatment also led to a change in proteolysis mechanism modifying the variety of the peptides produced. Thus, this kind of processing can be considered as a new parameter of control of the enzymatic proteolysis.

Keywords

Enzymatic proteolysis, protein denaturation, hydrolysates, peptides, rapeseed napins

1. Introduction

Nowadays, enzymatic proteolysis is widely implemented at industrial scale in order to improve functional properties, increase digestibility or reduce allergenicity of food proteins (Korhonen & Pihlanto, 2006). Besides, proteolysis can be used to produce hydrolysates containing various bioactive peptides (Adje, Balti, Kouach, et al., 2011; Kapel, Rahhou, Lecouturier, Guillochon, & Dhulster, 2006; Megías et al., 2009) that interest high value-added fields like nutraceuticals, food safety (Korhonen & Pihlanto, 2006) and culture media for animal cells culture (Chabanon et al., 2008).

There are two main criteria classically associated to the proteolysis process performance: the reaction kinetics and the peptide composition of the mixture produced. These depend on (i) the operating conditions (like enzyme over substrate ratio (E/S), pH and temperature of the reaction and proteolysis duration), (ii) the protein primary sequence and (iii) the protease cut specificity. To simplify things, reaction kinetics is meant to be dependent on E/S, reaction temperature and pH whereas the peptide composition principally depends on protein sequence and protease specificity. Nevertheless, the reaction is more complicated since evidences show that the operating conditions can also impact peptide composition.

Besides that, the exposure of peptide bonds to proteases also plays a key role in the proteolysis reaction. In other words, the protein structure can also influence kinetics and peptide profiles generated. Interestingly, many authors demonstrated that the production of bioactive peptides can be improved when the protein used is under a denatured state. In these cases, the protein denaturation is obtained using a chaotropic agent (urea), alcoholic solvents (methanol, ethanol, propanol and butanol) (Aschi, Mbarek, Othman, & Gharbi, 2008; Adje, Balti, Kouach, et al., 2011) or under high pressures (Dufour, Hervé, & Haertle, 2004; Stapelfeldt, Petersen, Kristiansen, Qvist, & Skibsted, 1996). However, these denaturation ways are inappropriate for industrial proteolysis because they would imply the use of cost consuming solvent recycling steps or high-pressure reactors. Protein denaturation can also be achieved by heat treatment. This kind of treatment consists in heating proteins at high temperatures (generally from 90 °C to 100 °C). The treated proteins are then cooled down or

dried before use as substrate for proteolysis. Interestingly, such treatments also demonstrated their influence on the sequence of the peptides produced by proteolysis (Cui, Zhou, Zhao, & Yang, 2009). In this case, the denaturing treatment is convenient for industrial proteolysis, but the treatment is most often applied empirically and there is no simple operating condition that allows to control the protein denaturation.

Napins from rapeseed are small molecular size proteins (12-15 kDa) composed of large and small subunits (9-10 and 4-4.5 kDa respectively). The napin's sequence shows different interesting bioactive peptides and has a structure rich in charged α -helix, favourable for antimicrobial bioactivity (Nioi, Kapel, Rondags, & Marc, 2012). Furthermore, napins constitute a significant part of the rapeseed meal (10 to 15 %), which is an abundant side product of the oil extraction process. As a consequence, napins are proteins of interest for proteolysis.

This work reports a thermal stability study of napins from rapeseed meal by micro differential scanning calorimetry. The influence of the pH on the thermostability was considered. Then, the evolution of napins denatured fractions under acid (pH 3) and basic condition (pH 11) at 50 °C and 75 °C were investigated in the course of time. To do so, the amount of denatured fraction was assessed by fluorescence. From the results obtained, the effect of a pre-incubation duration at the pH and the temperature of the proteolysis conditions, prior to protease addition on napins proteolysis, was investigated. Alcalase[®] was the enzyme used for this study. The impact of the pre-incubation duration of substrate on proteolysis kinetics and on peptide production was assessed by RP-HPLC.

2. Material and methods

2.1. Material

The industrial rapeseed meal, obtained by prepress solvent extraction system was supplied by Robbe-Novance (Compiègne, France). The rapeseed contained 8 % (w/w) water, 3 % (w/w) residual oil and 38 % (w/w) proteins. The denaturant agent (Guanidinium Chlorure: Gdn.HCl) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, Steinheim, Germany). Alcalase[®] 2.4 L(2.4 AU.g⁻¹), a non-specific serine protease from *Bacillus licheniformis*, was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Steinheim, Germany).

2.2. Extraction and purification of napins

Extraction-purification of napins from the industrial meal was achieved according to Nioi et al., 2012. Solid-liquid extraction was carried out at room temperature in water at pH 2 for 15 min and meal concentration of 12 % (w/w). The HCl 5 N was used for pH adjustment. The

liquid phase was collected after a centrifugation at 10,000 g and room temperature for 30 min. Then, the liquid phase was adjusted at 65 % saturation in ammonium sulphate and incubated during 30 min at room temperature. Saturated solutions were centrifuged as mentioned above. Pellets were solubilised in water up to one third of the initial volume. The obtained solution was eventually purified onto a Sephadex G-25 column (1.6 x 10 cm). The volume of sample represented 12 % of the column bed volume with corresponding to 30 mg of protein. The elution was performed with an AKTA purifier system (GE Healthcare Life-Science, Orsay, France) at a flow rate of 5 mL.min⁻¹ with deionised water at room temperature. The napins fraction, composed of around 95 % of napins (evaluated by kjeldhal method) was collected and freeze-dried for further structural analysis and proteolysis.

2.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC experiments were performed on a Microcal VP DSC system (Northampton, MA, USA). Samples were degassed prior analysis. A minimum of five scans with buffer in both the sample and reference cells were made in order to obtain a reproducible baseline. The influence of pH (3, 7, 11) on thermal denaturation of napins was investigated from 20 °C to 130 °C at a scanning rate of 1 °C.min⁻¹. After each DSC scan, temperature was decreased to 20 °C before rescanning the sample in order to evaluate the reversibility of the denaturation. The analyses were conducted in triplicate. Data were analyzed with ORIGIN[®] software (Microcal, Northampton, MA, USA).

2.4. Circular dichroism study (CD)

The secondary and tertiary structures of napins were studied both in far (190-250 nm) and near-UV (250-300 nm) by using a JCD6 dichrograph (Jobin Yvon, Longjumeau, France). CD spectra of napins were recorded at different pH (3, 7, 11). The reversibility of unfolding process after DSC treatments at different pH was also evaluated through CD analysis. 1 and 10 mm path length quartz cells were used in far and near UV regions, respectively. Chemical denaturation was studied through CD runs in far UV on samples in 20 mM phosphate buffer, pH 7, adjusted at various Gnd.HCl concentrations (from 0 M to 8 M). Each Spectrum was the average of three successive scans. The concentrations of napins were 0.15 mg.mL⁻¹ and 1.5 mg.mL⁻¹ in far and near UV, respectively. Buffer scans, recorded under identical conditions, were subtracted from the napins spectra.

2.5. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence measurements were obtained with a SPEX Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermostated cell compartment (25 °C), using a 450 W Xenon lamp. Excitation wavelength was 280 nm and the emission intensity was monitored at wavelength ranging 290-450 nm. Measurements were carried out in triplicate. Napins concentration was 0.4 mg.mL⁻¹.

2.6. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis was carried out in a 50 mL thermostated reactor connected to a thermostated bath Polystat 11-33197 (Bioblock Scientific, France). Napins were suspended at 10 g.L⁻¹ in deionised water at pH 9 and 50 or 75 °C. Fluorescence assessment showed that 30 min of incubation duration induce different structural states of napins, thus the Alcalase[®] was added with or without a 30 min pre-incubation of proteins under these conditions. In every case, hydrolysis lasted 3 h and the enzyme over substrate ratio [E/S] was 6.8 x 10³ AU.g⁻¹ (according to Chabanon et al., 2006). The reactions were stopped by heating mixtures in boiling water for 15 min. NaOH (1 N) was added to keep the pH constant during hydrolysis by a pH-Stat (736 GP Titrino, Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland). NaOH volume added was recorded in order to calculate degree of hydrolysis (DH) in the course of the hydrolysis by using the following formula:

$$DH (\%) = \frac{B N_B}{M_p \alpha h_{tot}} 100$$

where B is the volume (mL) of base consumed, N_b is the normality of base, M_p is the mass of proteins (g), α is the degree of dissociation of α -amino groups related to the pK of the amino groups at particular pH and temperature and h_{tot} (meq.g⁻¹) is the sum of the millimoles of individual amino acids per gram of protein associated to the source of protein used in the experiment (7.6 was fixed according to napins sequence from Rico et al., 1996).

2.7. RP-HPLC analysis

The peptide compositions of hydrolysates were compared by RP-HPLC (Shimadzu system) analysis on a C4 column (250 mm × 2,1 mm) Prosphere 300 Å (Alltech, Deerfield, IL, USA). The elution was made using water/acetonitrile/trifluoroacetic acid (95/5/0.5 v/v/v) as eluent A and acetonitrile/water/ trifluoroacetic acid (95/5/0.5 v/v/v) as eluent B. The gradient applied was 0-30 % B over 40 min, then 30-100 % over 30 min at 0.5 mL.min⁻¹ and 35 °C. 10 µL of

samples filtered through 0.22 µm filters (Minisart, Millipore, Billerica, MA, USA) were injected onto the column. Absorbances at 226 nm were monitored online.

3. Results and discussion

3.1. Study of napins thermal stability

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to investigate the napins thermal stability under acid (pH 3), neutral (pH 7) and basic (pH 11) conditions. Figure 1 shows that thermograms of napins at these three pH are all under a main endothermic peak with a shoulder. However, these peaks are observed at different temperature levels. At pH 3, the temperature range is from 90 °C to 130 °C while it is from 80 °C to 115 °C and from 60 °C to 90 °C at pH 7 and 11 respectively. Several models of thermal denaturation were tried to fit experimental data in order to elucidate thermal denaturation mechanisms at the three pH values. The independent non two-state model with two transitions was found to be the most appropriate because of similarity between calculated and experimental data. Such a mechanism was shown as well-adapted with napins from *Brassica juncea*, having primary sequences close to napins from *Brassica napus*. In this case, Cp changes as a function of the temperature are given by the following equation:

$$C_p = \frac{K_{a1} \Delta H_{vH1} \Delta H_1}{(1 + K_{a1}) RT^2} + \frac{K_{b2} \Delta H_{vH2} \Delta H_2}{(1 + K_{b2}) RT^2}$$

With,

$$K_{a1} = e^{\left(\frac{-\Delta H_{vH1}}{R} \left(1 - \frac{T}{T_{m1}} \right) \right)}$$

and

$$K_{b2} = e^{\left(\frac{-\Delta H_{vH2}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_{m2}} \right) \right)}$$

Cp is for the heat capacity (in kcal.°C⁻¹.mol⁻¹),

ΔH_{vH1,2}, Van't Hoff enthalpies of transition 1 and 2 (in kcal.mol⁻¹),

ΔH_{1,2}, calorimetric enthalpies of transition 1 and 2 (in kcal.mol⁻¹),

T_{m1,2}, temperatures at the maximum heat capacity transition curves 1 and 2, (called transition temperatures for convenience, in °C

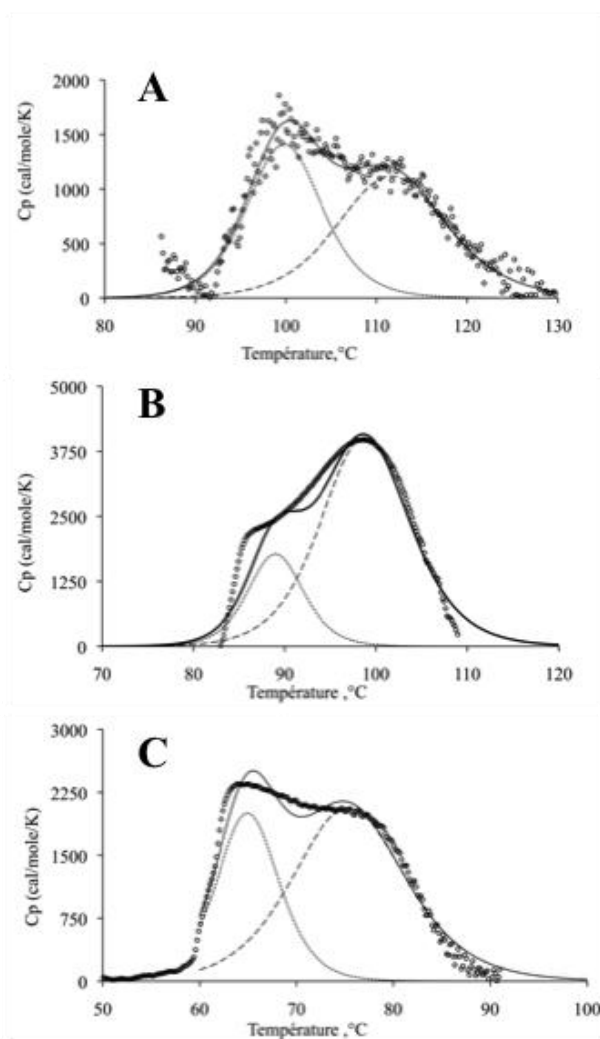


Figure 1. DSC scans of napins from rapeseed meal at pH 3 (A), pH 7 (B) and pH 11 (C). Data points are shown as open circles while solid lines represent the fit of DSC data to the non-two-state transition model. Dotted and dashed lines indicate the two individual transitions obtained from the fit. Concentration of napins was 7 g. L⁻¹. Scan rate was 1°C.min⁻¹.

Figure 1 shows that thermograms fitting are not perfect though. Napins studied in this study were extracted from an industrial rapeseed meal. This choice was made because proteins implemented in proteolysis are frequently from industrial side-products. But the industrial rapeseed meal used is from an oil extraction process having heat treatment (around 55 °C) and solvent (hexane) extraction steps. As a consequence, “our” napins are likely to be under different folding states. Besides, napins, like many proteins from vegetal sources are known to be composed of different isoforms having small sequence changes (Murén, Ek, Björk, & Rask, 2004). That probably explains the slight differences between calculated and experimental curves. Nevertheless, fittings were considered well enough for transition temperatures assessments.

As can be seen in Fig. 1A, at pH 3, the first and second transitions were observed at $T_{m1} = 99.89$ °C and $T_{m2} = 111.80$ °C, respectively. This demonstrates the high thermostability of rapeseed napins from rapeseed meal. A clear gap of transition temperatures was observed when increasing pH to 7 ($T_{m1} = 89.03$ °C and $T_{m2} = 98.89$ °C) and then to 11 ($T_{m1} = 65.01$ °C and $T_{m2} = 75.54$ °C) (Fig. 1B and C).

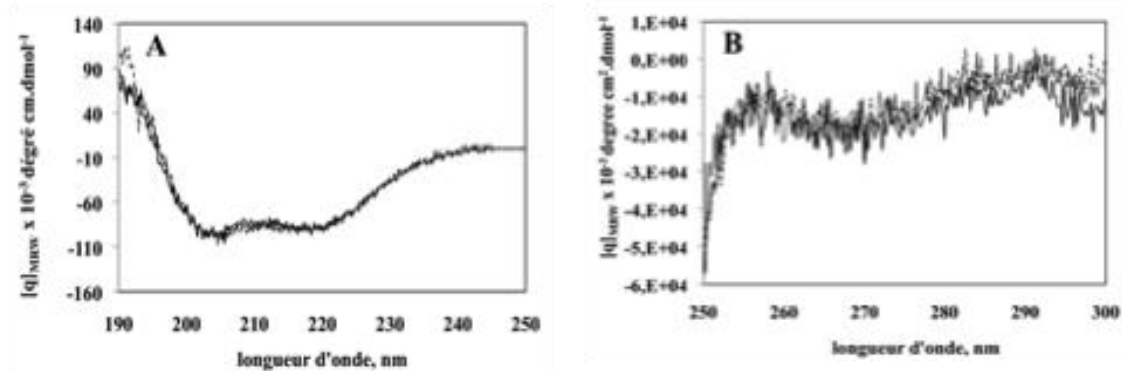


Figure 2. Far-UV (A) and near-UV (B) spectra of napins at pH 3, pH 7 and pH 11. Napins concentration was 0.15 mg.mL^{-1} in far-UV and 1.5 mg.mL^{-1} for near-UV. Analyses were made at 20 °C.

That clearly proves that napins are far less thermostable under basic condition than under acidic one. Proteins are classically meant to be less stable at pH far from their isoelectric point (pI) (Pace, Laurents, & Thomson, 1990). Basically, in these conditions, acidic/alkaline lateral chains are greatly charged (either positively at pH lower to pI or negatively at pH higher to pI). This should lead to intramolecular charge repulsions, which would overcome internal attractive forces (mostly hydrophobic and dispersive), resulting in a partial unfolding of the protein. Napins pI is around 11 (Rodrigues, Coelho, Graça, & Carvalho, 2011), which makes our result surprising. However, such a counterintuitive behaviour was observed in few cases. As an example, ovalbumin has a maximum thermal stability at around pH 11 for an isoelectric point of 4 (Grinberg, Burova, Haertlé, & Tolstoguzov, 2000).

The effect of pH on napins without heating was studied by circular dichroism as a control.

Figure 2A shows spectra of napins at pH 3, 7 and 11 in far UV. It shows very close patterns with two minima at 208 and 222 nm. This clearly indicates that napins are particularly rich in α -helix and that the sole effect of pH does not modify the secondary structure of napins. Spectra in near UV region in the above-mentioned pH range are shown in Figure 2B. These spectra are also almost identical, and have a minimum at 270 nm and two maxima at 290 nm

and around 255 nm which corresponding to tyrosine, tryptophan and phenylalanine respectively.

This shows that pH alone does not affect napins structure at room temperature, but, as we showed by DSC analysis, if the pH is coupled with temperature a napins structure is modified. Such an information is valuable since it indicates that a heat treatment of napins for a full denaturation would likely be less energy consuming at high pH. However, no data on napins denaturation level as a function of pH or temperature can be given from this study. This kind of information should be even more valuable in order to implement napins at controlled denaturation state in enzymatic proteolysis.

3.2. Kinetics of thermal denaturation at different pH

Protein denaturation is known to be a kinetically controlled process. But the phenomenon is relatively hard to study and is rarely shown in the literature. In this study, we propose to observe napins denaturation by heat treatment at different pH by fluorescence. Indeed, the fluorescence of a tryptophan (Trp) is highly sensitive to the microenvironment of Trp residue and can reflect changes in tertiary protein structure (Eftink & Shastry, 1997). A highly polar surrounding generally results in Trp emission shift to longer wavelengths (red shift), while a more hydrophobic environment results in emission shift to weaker wavelengths (blue shift). Napins contain two tryptophan residues and conformational changes will expose these residues inducing a shift towards a maximum wavelength of emission (λ_{max}). Figure 3 shows the modification of napins denatured fraction at 25 °C and 75°C under different pH conditions (3 and 11) during 30 min. The denatured fraction (F_u) (Kavitha et al., 2010) was assessed as below:

$$F_u = \frac{\lambda_f - \lambda_x}{\lambda_f - \lambda_u}$$

λ is the wavelength at the maximum intensity of napins at the considered pH, without heat treatment (λ_f), after a heat treatment (λ_x) and after a full denaturing treatment by strong chaotropic agent (guanidinium chloride 6 M) at the considered pH (λ_u).

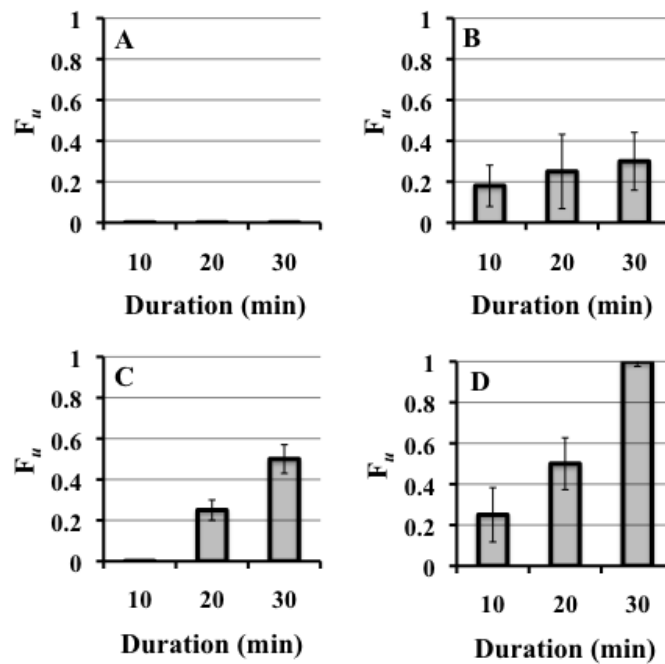


Figure 3. Evolution of napins denatured fraction after 10 mn, 20 mn and 30 mn at pH 3 and 25 °C (A), at pH 3 and 75 °C (B), pH 11 and 25 °C (C) and pH 11 and 75 °C (D). Normalized unfolded fractions were calculated as explained in the text.

At pH 3, no denaturation occurred during 30 min at 25 °C. At 75 °C, the denaturation starts earlier (from 10 min) but stays low (28 % at 30 min). This level remains unchanged after at 20 and 30 min of treatment. At pH 11, the denatured fraction represents 25 % at 25 °C from 20 min and rises up to 50 % at 30 min. At 75 °C, the denaturation process takes place at an early stage and get full (100 %) at 30 min of treatment.

As expected, this confirms clearly that napins are by far more sensitive to heat treatment under basic condition than under neutral or acidic one. These results also show that denaturation takes place at temperature significantly below the transition temperatures measured by DSC. Indeed, at pH 3 (lowest T_m, near 100 °C), a small but significant part of napins were under a denaturated state after 30 min of a heat treatment and 75 °C. Interestingly, at pH 11, heat treatments at 25 °C yielded high amount of napins denatured at 30 min of treatment (50 %), while napins were fully denatured at 75 °C. In other words, a large range of napins structuration states can be obtained after a reasonably short treatment at pH and temperatures compatible with enzymatic proteolysis. This means that, under basic

condition, incubation of napins is interesting for proteolysis because get protein at different conformational state. But to be considered as a new efficient parameter of proteolysis control, this incubation duration should have an impact on the proteolysis process affecting the proteolysis kinetics and the peptide production.

3.3. Effect of napins incubation on the enzymatic proteolysis kinetics

Amongst industrial proteases classically used, Alcalase[®] is known to work under basic condition (optimum activity at pH 9) at temperatures ranging from 30 to 80 °C. Therefore, this enzyme was chosen to study the effect of the incubation duration on napins proteolysis. Proteolysis were carried out at pH 9 and temperature of 50 °C and 75 °C with an incubation duration of 30 min in these conditions and without any incubation. Fluorescence analysis indicated that after 30 min at pH 9, 50 °C and 75 °C, around 20 % and 40 % of napins were under a denatured state respectively (figure 4A and 4B inserts). The impact of the pre-treatment on proteolysis kinetics at 50 °C (figure 4A) and 75 °C (figure 4B) were studied. At 50 °C, the two curves are under the same shape for the 30 first min, then the proteolysis rates are slightly increased without incubation. DH reached at 3 h of hydrolysis are of 15 % (± 0.01) and 18 % (± 2) with and without incubation respectively. At 75 °C, DH after 3 h of proteolysis is significantly higher with incubation (21 % ± 1.4) than without incubation (14 % ± 0.9).

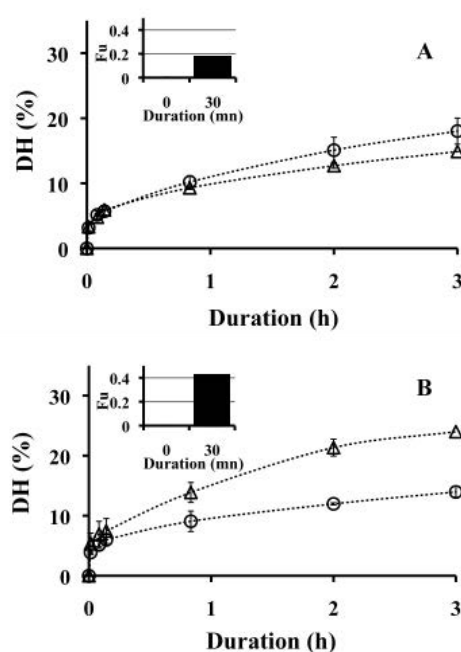


Figure 4. Proteolysis kinetics of napins by Alcalase[®] at pH 9 ($E/S = 6.8 \times 10^3 \text{ AU.g}^{-1}$) and a temperature of 50 °C (A) or 75 °C (B). Proteolysis were carried out after incubation of 30 minutes of napins at pH and temperature of the proteolysis (Δ) or without any incubation (\circ). Concentration of napins was 10 g.L^{-1} .

Without incubation, Alcalase[®] activity at pH 9 is slightly higher at 50 °C than at 75 °C, which is consistent with data on Alcalase[®] activity (optimal temperature reported at 50 °C). A 30 min incubation at 50 °C prior adding had just a little impact on proteolysis kinetics (the difference observed might even be not significant). This means that the opening of napins structure due to the pre-treatment under these conditions during the 30 min of incubation was not sufficient to modify the action of the protease. However, the treatment at 75 °C was sufficient to open napins structure enough to improve the accessibility of Alcalase[®]. This resulted in a high improvement of proteolysis kinetics since the DH obtained after 3 h without incubation is obtained after less than 1 h. Furthermore, enzymatic rates observed at 75 °C with incubation even appeared to be slightly higher than at 50 °C without incubation (close to the optimal conditions). Then, the impact of the incubation on peptides produced at 75 °C and pH 9 was investigated. Figure 5 shows RP-HPLC chromatograms of hydrolysates at 3 %, 6 %, 9 % and 12 % of DH with and without incubation (5A and 5B respectively). Without incubation the peptide profiles remains identical whatever the DH. An increase of the peak heights is observed with DH though. This pattern is characteristic of a one-by-one mechanism, in which proteins are fully hydrolysed into the same set of peptides one after another (Rupley, Butler, Gerring, Hartdegen, & Pecoraro, 1967). Nonetheless, in this kind of mechanism, proteins signal is progressively decreasing. In our case, no napins peak can be seen in the early stages of proteolysis. This is probably explained by napins precipitation that would occur during the 15 min of treatment at 100 °C applied to stop the reaction. Hydrolysates obtained with 30 min of incubation prior protease adding are clearly different at the beginning of the proteolysis. At 3 % of DH two fractions of peptides are generated, a hydrophilic one that poorly interacted with the stationary phase (from 5 to 7 min of retention time) and a more hydrophobic fraction from 15 to 20 min of retention time). At 6 % of DH, the hydrophobic fraction revealed to be partially hydrolysed into another fraction less hydrophobic (retention time from 10 to 12 min). Then the profile remains the same at 9 % and 12 %. This evolution indicates that the proteases act differently on napins when they are partially denatured by the heat treatment at 75 °C. In this case, it seems that proteolysis is rather under a zipper mechanism (Nedjar-Arroume et al., 2008). Such a mechanism is observed when cut sites in the protein sequence are largely exposed to proteases, which is the case when proteins are highly denatured. In this case, proteins are greatly hydrolysed at the first instant of the proteolysis into a first set of intermediate peptides. Then intermediate peptides are substrates of proteases and are subsequently hydrolysed into final peptides. This mechanism is particularly interesting since bioactive peptides of interest (antimicrobial and

opioid peptides) are intermediate peptides (Adje, Balti, Kouach, et al., 2011; Dhulster et al., 2002). Furthermore, to date, such a mechanism was observed with proteins denatured by chaotropic agents or solvents (Adje, Balti, kouach, Guillochon, & Nedjar-Arroume, 2011; Froidevaux et al., 2001). In this case, a simple incubation of 30 min prior to enzyme addition revealed to be able to switch the proteolysis mechanism. This duration (pre-treatment) could become an interesting new operating condition to improve the proteolysis process.

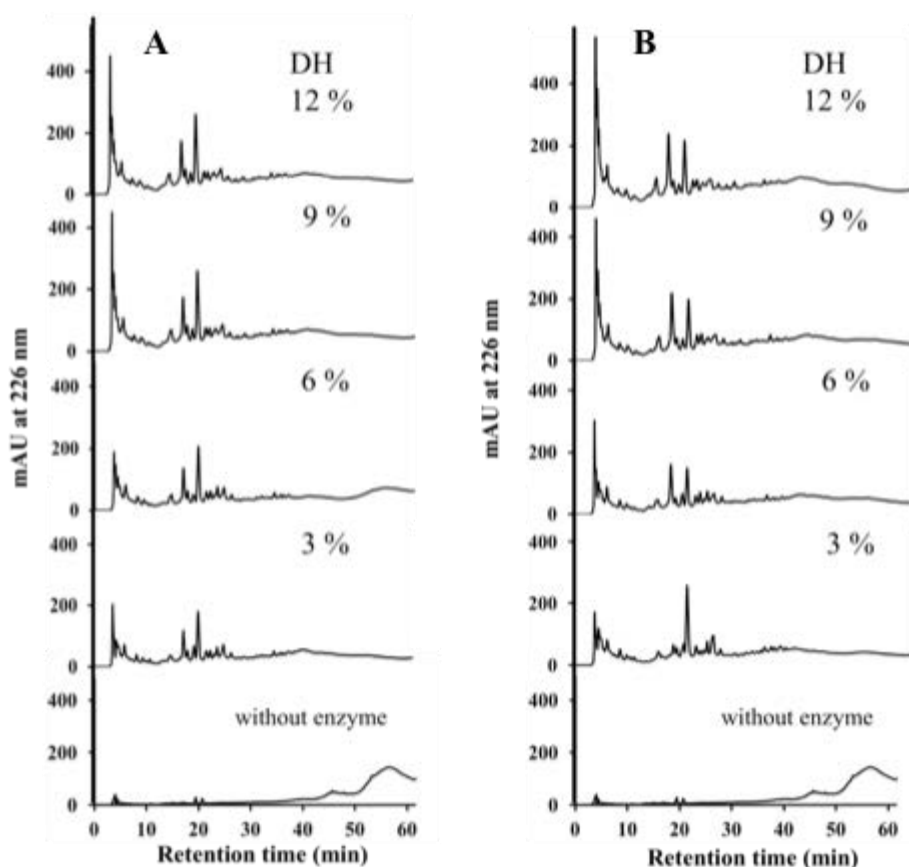


Figure 5. RP-HPLC chromatograms of napins hydrolysates at 3 %, 6 %, 9 % and 12 % of DH. Proteolysis were carried out with Alcalase® at pH 9 and 75 °C ($E/S = 6.8 \times 10^3 \text{ AU.g}^{-1}$). The enzyme was added after 30 minutes of napins solution incubation at pH 9 and 75 °C (B) and without incubation (A).

4. Conclusion

A study of thermal denaturation of napins at pH 3, 7 and 11 by DSC demonstrated that napins are particularly thermostable under acidic and neutral conditions. However, at pH 11 condition, transitions temperatures were observed under 80 °C. This indicates that a heat treatment of napins could be far more efficient under alkaline condition than acidic one. The

evolution of napins denatured fraction at pH 3 and pH 11, 50 °C and 75 °C in the course of time clearly confirmed that. High levels of denaturation were observed at pH 11 after 30 min at 50 °C and 75 °C. This result revealed to be particularly interesting since significant denaturations of protein could be obtained after a reasonable duration at pH and temperatures compatible with proteolysis. It is the reason why the influence of napins denaturation controlled by incubation duration, prior to enzyme addition, in the condition of the proteolysis was investigated. A 30 min of incubation at pH 9 and 75 °C prior Alcalase[®] addition clearly showed to improve proteolysis kinetics. The kinetic results observed in this case were even slightly better than proteolysis kinetics at optimal temperature (50 °C). This incubation also led to modify napins conformation enough to have an impact on the mechanism of proteolysis. So, in appropriate conditions of pH and temperature (determined by relatively simple investigations), a duration of incubation at pH and temperature of proteolysis prior to enzyme addition can be seen as a new simple operating condition of the proteolysis controlling both kinetics and peptide composition of hydrolysates produced.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Alexandre Kriznik and Sophie Rahuel for their support in collecting DSC data and the “Service commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires” (SCBIM) for the use of Microcal VP DSC and JCD6 discograph instruments. We thank Celine Frochot for cooperation and precious advice in fluorescence analysis and Xavier Framboisier for RP-HPLC analysis.

References

- Adje, E. Y., Balti, R., Kouach, M., Dhulster, P., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49 (2), 143–153.
- Adje, E. Y., Balti, R., kouach, M., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *European Food Research and Technology*, 232 (4), 637–646.
- Aschi, A., Mbarek, N., Othman, M., & Gharbi, A. (2008). Study of thermally and chemically unfolded conformations of bovine serum albumin by means of dynamic light scattering. *Materials Science and Engineering: C*, 28 (5), 594–600.
- Chabanon, G., Alves da Costa, L., Farges, B., Harscoat, C., Chenu, S., Goergen, J.-L., Marc, A., Marc, I., Chevalot, I. (2008). Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresource Technology*, 99 (15), 7143–7151.

- Cui, C., Zhou, X., Zhao, M., & Yang, B. (2009). Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10 (1), 37–41.
- Dhulster, P., Kapel, R., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N., Fertin-Bazus, A., Choisnard, L., & Guillochon, D. (2002). Advancement in intermediate opioid peptide production in an enzymatic membrane reactor assisted by solvent extraction. *Desalination*, 148 (1), 221–226.
- Dufour, E., Hervé, G., & Haertle, T. (2004). Hydrolysis of beta-lactoglobulin by thermolysin and pepsin under high hydrostatic pressure. *Biopolymers*, 35 (5), 475–483.
- Eftink, M. R., & Shastry, M. C. (1997). Fluorescence methods for studying kinetics of protein-folding reactions. *Methods in enzymology*, 278, 258–286.
- Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P., Guillochon, D. (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS letters*, 491(1), 159–163.
- Grinberg, V. Y., Burova, T. V., Haertlé, T., & Tolstoguzov, V. B. (2000). Interpretation of DSC data on protein denaturation complicated by kinetic and irreversible effects. *Journal of biotechnology*, 79 (3), 269–280.
- Kapel, R., Rahhou, E., Lecouturier, D., Guillochon, D., & Dhulster, P. (2006). Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochemistry*, 41(9), 1961–1966.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16 (9), 945–960.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., & Vioque, J. (2009). Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification. *LWT-Food Science and Technology*, 4 (1), 228–232.
- Monsalve, R. I., Villalba, M., López-Otín, C., & Rodríguez, R. (1991). Structural analysis of the small chain of the 2S albumin, napin nIII, from rapeseed. Chemical and spectroscopic evidence of an intramolecular bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1078 (2), 265–272.
- Murén, E., Ek, B., Björk, I., & Rask, L. (2004). Structural comparison of the precursor and the mature form of napin, the 2S storage protein in Brassica napus. *European Journal of Biochemistry*, 242 (2), 214–219.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., Guillochon, D. (2008). Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 29 (6), 969–977.
- Nioi, C., Kapel, R., Rondags, E., & Marc, I. (2012). Selective extraction, structural characterisation and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal. *Food Chemistry*, 134 (4), 2149–2155.
- Pace, C. N., Laurents, D. V., & Thomson, J. A. (1990). pH dependence of the urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. *Biochemistry*, 29 (10), 2564–2572.
- Rico, M., Bruix, M., González, C., Monsalve, R. I., & Rodríguez, R. (1996). 1H NMR Assignment and Global Fold of Napin BnIb, a Representative 2S Albumin Seed Protein. *Biochemistry*, 35(49), 15672–15682.

- Rodrigues I.M., Coelho, J.J., Graça, M., Carvalho VS. (2011). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential, *109* (3), 337–346.
- Rupley, J. A., Butler, L., Gerring, M., Hartdegen, F. J., & Pecoraro, R. (1967). Studies on the enzymic activity of lysozyme, 3. The binding of saccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *57* (4), 1088–1095.
- Stapelfeldt, H., Petersen, P. H., Kristiansen, K. R., Qvist, K. B., & Skibsted, L. H. (1996). Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis of beta-lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. *The Journal of dairy research*, *63* (1), 111–118.

2.2.1. Contributions de l'article

Les travaux de cet article montrent l'effet de la température, du pH et de la durée d'incubation sur la structure des napines. Ceci a été réalisé à l'aide de techniques appropriées, telles la calorimétrie différentielle à balayage et la fluorescence. A partir de ces résultats, l'effet de la durée d'incubation avant l'ajout de la protéase (Alcalase®) sur la protéolyse des napines, a été étudié. D'après un suivi cinétique de dénaturation à différents couples de pH/T, il est apparu qu'une durée d'incubation relativement courte (30 mn) induit une dénaturation significative des napines à pH basique et à une température modérée (70 °C). L'originalité de ce travail repose sur ce type d'approche. En effet, plusieurs études rapportent l'effet du pH et de la T sur la structure des protéines mais l'effet cinétique de ces deux paramètres a été rarement observé. Par ailleurs, les travaux montrent une importante influence de l'état structural initial du substrat sur la cinétique de protéolyse et le mécanisme enzymatique. L'analyse qualitative réalisée par CLHP-PI montre que les différents profils peptidiques sont influencés par l'état structural initial du substrat. Etant donné que les bioactivités des mélanges dépendent de leurs propriétés physico-chimiques, les résultats laissent présager la production de peptides ciblés « contrôlée » par ce nouveau paramètre : la durée d'incubation de la protéine.

2.3. Propriétés biologiques des mélanges obtenus

Après avoir mis en évidence que la durée d'incubation du substrat est responsable de la cinétique de protéolyse ainsi que des propriétés physico-chimiques des mélanges libérés, une étude a été conduite sur leurs propriétés biologiques. Parmi les bioactivités, l'influence sur la croissance de cellules animales et leur pouvoir antimicrobien ont été validés. Les expériences sur les cellules animales (productrice d'anticorps) sont réalisées dans le but de substituer la source d'azote d'origine animale, souvent cause de contamination des procédés biotechnologiques, par une source d'origine végétale. Les essais antimicrobiens concernent l'inhibition de la croissance d'une bactérie (*Bacillus coagulans*) responsable des contaminations alimentaires (boîtes de conserve). Une application des hydrolysats produits dans le secteur pharmaceutique et de la sécurité alimentaire pourrait être ainsi envisagée.

2.3.1. Influence des mélanges obtenus sur la croissance des cellules animales

Les napines et leurs hydrolysats ont été évalués pour leur capacité à stimuler la croissance des cellules animales, en tant qu'additifs du milieu de culture. Pour cela des cellules d'ovaire de hamster chinois CHO-AMW, productrices d'anticorps, ont été cultivées en microplaque 96 puits dans un milieu de culture supplémenté avec les hydrolysats (1 g.L^{-1}). Les concentrations cellulaires atteintes après 140 h de ces cultures sont comparées à celle du milieu de référence (sans hydrolysats). La figure 35 présente les cinétiques de croissance cellulaire du milieu de référence et des hydrolysats obtenus selon les différentes conditions. La croissance cellulaire en présence de napines intactes n'a pas pu être prise en compte du fait d'un défaut de comptage de l'appareil. En effet, la protéine rend le milieu trouble, empêchant la détection précise des unités cellulaires. Ces résultats n'ont pas pu être correctement exploités.

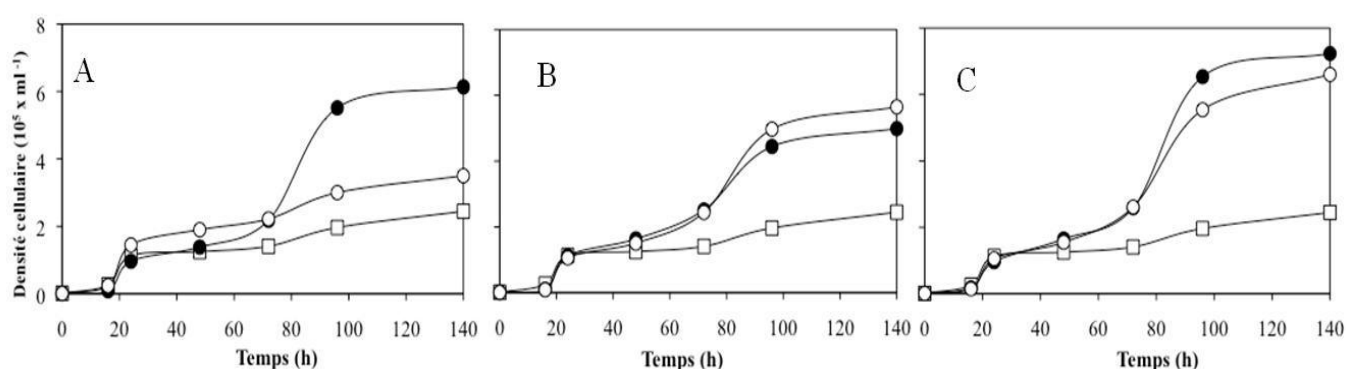


Figure 35. Cinétique de croissance de cellules CHO-AMW dans des milieux de référence, non supplémenté (□) et supplémentés avec 1 g.L^{-1} d'hydrolysats de napines non prétraitées (●) et incubées 30 mn avant hydrolyse (○) à 25 °C (A), 50 °C (B) et 75 °C (C).

D'après la figure 35 on observe que quelles que soient les conditions opératoires, les hydrolysats améliorent la croissance des cellules animales CHO-AMW. Toutefois, on remarque (figure 35 A) que les deux hydrolysats obtenus à 25 °C ont un effet propre qui dépend du prétraitement du substrat. Le mélange issu des napines non dénaturées (DH = 9,3 %) augmente la croissance cellulaire jusqu'à $6 \times 10^5 \text{ cellules.mL}^{-1}$, en l'occurrence 3 fois plus que celle du milieu de référence ($2 \times 10^5 \text{ cellules.mL}^{-1}$). Par ailleurs, l'hydrolysats (DH = 10 %) généré par le substrat dénaturé à 25 °C n'influence que faiblement la croissance cellulaire ($3 \times 10^5 \text{ cellules.mL}^{-1}$). Une élévation de la température d'hydrolyse à 50 °C, quel que soit le prétraitement du substrat, génère des peptides qui permettent de doubler le nombre de

cellules. L'augmentation se révèle encore plus importante pour les hydrolysats produits à 75 °C à partir des napines non dénaturées (DH = 14 %) et dénaturées (DH = 21 %). Pour ces deux conditions, la population cellulaire a été plus que triplée.

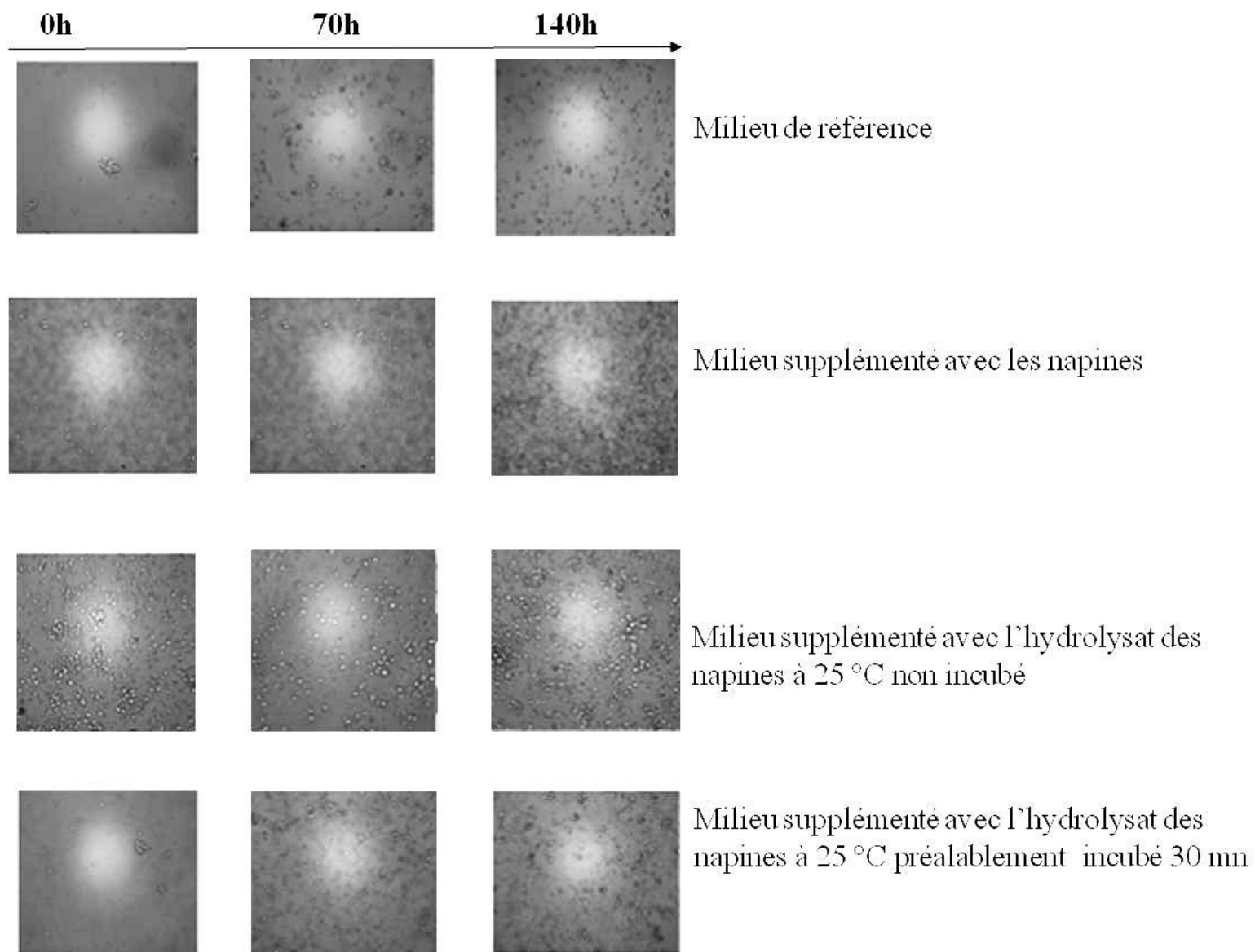
Le tableau 6 résume l'ensemble de ces observations. Ainsi, une influence variable des mélanges peptidiques issus de la protéolyse d'un substrat pris à différents états de structuration est observée.

Tableau 6. Influence des mélanges, obtenus à partir de napines hydrolysées à différents états de structuration, sur la croissance de cellules CHO.

Traitement du substrat	Conditions de protéolyse		
	25 °C	50 °C	75 °C
référence	$2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$	$2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$	$2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
Sans incubation	$6 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$	$5,5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$	$7,8 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
Avec incubation	$3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$	$5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$	$7,5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$

Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature, et confirment la possible utilisation des peptides d'origine végétale comme stimulateurs de la croissance des cellules animales (Farges *et al.*, 2006 ; Franek *et al.*, 2004). Il est supposé que les petits peptides (5-15 résidus) cationiques arrivent à s'introduire à l'intérieur de la cellule grâce à des interactions au niveau de la surface membranaire des cellules (Mosser *et al.*, 2012). Vraisemblablement, ces hydrolysats seraient constitués d'une portion hydrophile commune, qui doit être impliquée dans le mécanisme de stimulation de la croissance cellulaire. Des études récentes ont mis en évidence l'importance du rôle positif de tri- ou dipeptides contenant des résidus d'arginine en position C-terminale (Schmidt *et al.*, 2011). Conjointement, les napines sont connues pour leur richesse en Arginine et Lysine (Jyothi *et al.*, 2007). Grâce à sa spécificité réduite, l'Alcalase[®], semble appropriée pour favoriser la libération de ces petits peptides contenant les résidus d'intérêt.

Notre étude a été complétée avec un examen morphologique des cellules, obtenu à l'aide d'un analyseur d'images (Cell Screen[®]). La figure 36 montre bien l'augmentation du nombre de cellules lorsque le milieu est supplémenté avec les hydrolysats de napines. Toutefois, la croissance des cellules CHO-AMW est inhibée en présence de napines dans le milieu de culture. En effet on observe une opacité du milieu dans ces conditions opératoires (Figure 36). Cela peut certainement s'expliquer, entre autres choses, par des particularités liées à leurs propriétés antimicrobiennes et leur capacité à interagir avec les protéines membranaires. Pour



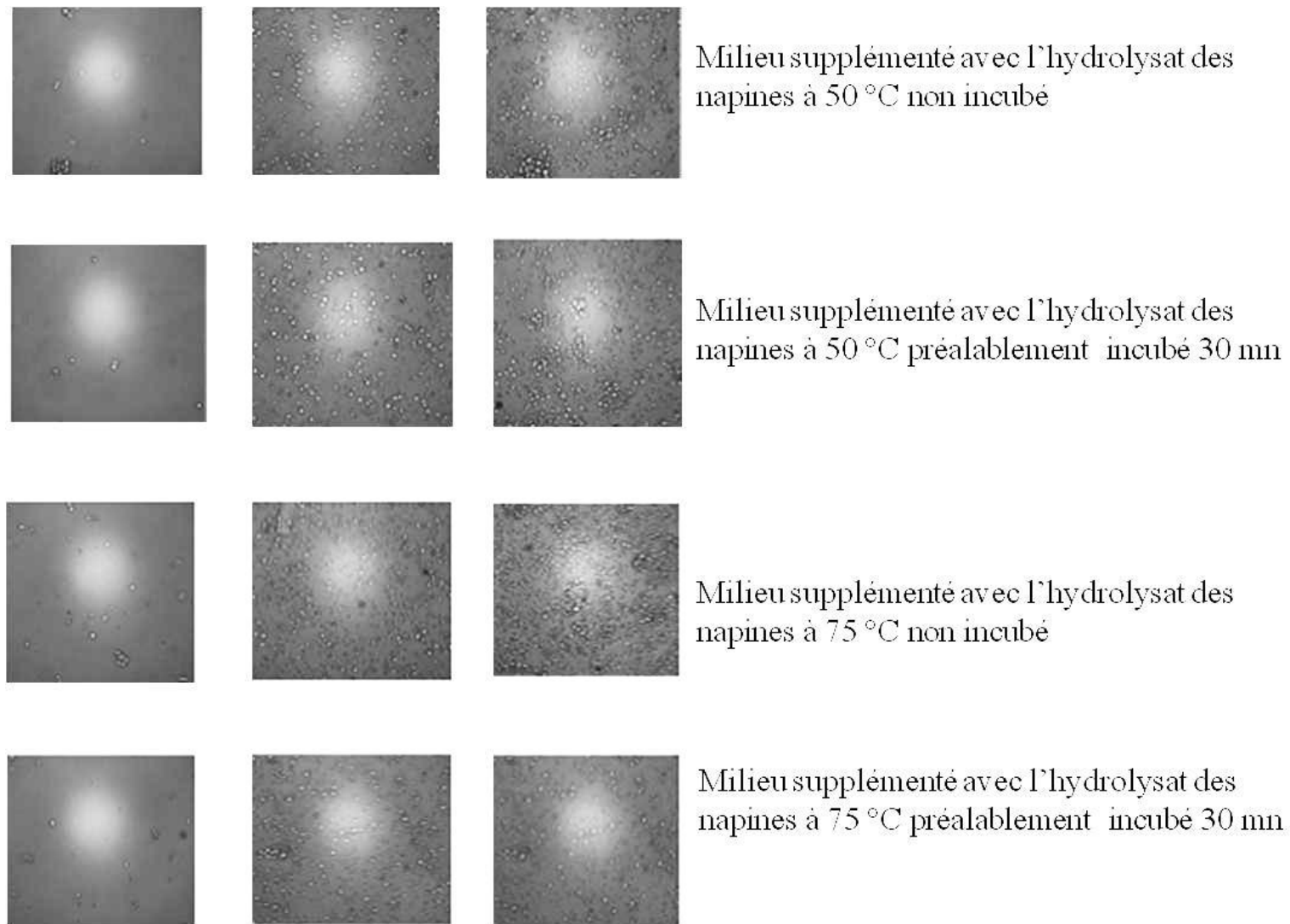


Figure 36. Photographies numériques des cellules CHO-AMW pendant la culture à t 0 h, t 70 h et t 140 h. Le suivi est effectué sur la croissance des cellules dans le milieu référence (non supplémenté) et supplémenté avec les hydrolysats de napines à 25 °C, 50 °C, 75 °C. Les photos sont obtenues à l'aide d'un analyseur d'images (Cell Screen)

ce qui concerne l'effet des hydrolysats, on observe une augmentation du nombre des cellules pour tous les hydrolysats. Toutefois, la prolifération est moins importante lorsque le milieu est supplémenté avec l'hydrolysat des napines préalablement incubées à 25 °C. Ceci est en accord avec les cinétiques de croissance montrées auparavant (Figure 35). Les cellules sont rondes et brillantes pendant les premières 70 h et deviennent plus petites, obscures et agrégées les unes avec les autres, dans la phase finale de la cinétique (140 h). Cependant, après 140 h de culture les cellules dans le milieu de référence sont toujours vivantes. Un retard de leur mort est probablement lié à la disponibilité des nutriments. En effet, la rapide prolifération des cellules, cultivées en présence des hydrolysats, pourrait induire une contrainte environnementale (disponibilité d'espace et/ou de nutriments). Ceci laisse supposer que plus que un rôle nutritionnel, les protéolysats agissent comme des facteurs de croissance (Kunst, 2000).

Ainsi, cette étude montre :

- l'influence de l'état structural de la protéine sur les peptides générés et leur bioactivité,
- la possibilité de supplémenter un milieu de culture sans sérum avec un hydrolysat de napines de tourteau de colza.

2.3.2. Propriétés antimicrobiennes

La deuxième partie de cette étude a eu pour objet d'évaluer la capacité des hydrolysats, obtenus à un DH de 5, 10 et 20 % (si atteint), à inhiber la croissance de *Bacillus coagulans*. Cette bactérie est responsable des contaminations alimentaires dans les boîtes de conserve. Plus précisément, il provoque l'acidité de plats, surtout ceux base de tomate, en favorisant leur contamination par d'autres bactéries.

Les résultats du potentiel antimicrobien, montrés dans le tableau 7, sont remarquables avec les napines entières, quel que soit le traitement thermique subi. Ces résultats sont en accord avec ceux de la bibliographie, qui montrent l'activité antibactérienne envers plusieurs bactéries (Gram + et -) : *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus megaterium* (Kim *et al.*, 2009, De Souza *et al.*, 2011). En outre, ils sont cohérents avec l'étude de l'activité antifongique précédemment discutée dans le chapitre I. Toutefois, lorsque la protéine est hydrolysée l'activité peut disparaître. En effet, une croissance de la bactérie dans le milieu de culture est observée. Cela semble être lié aux DH atteints dans différentes conditions d'hydrolyse (prétraitement du substrat).

Tableau 7. Activité antimicrobienne envers *Bacillus coagulans* des hydrolysats ($H_{T^{\circ}C}$ avec $T^{\circ} = 25^{\circ}C, 50^{\circ}C, 75^{\circ}C$) de napines non traitées (t_0) et prétraitées (t_{30}). L'activité antimicrobienne est comparée à celle des napines entières (DH=0) traitées selon les différentes conditions opératoires. La concentration de la protéine et des hydrolysats est de 10 g.L^{-1} . Nomenclature : « + » : activité antimicrobienne observée, « - » pas d'activité observée.

DH (%)	$H_{25^{\circ}Ct_0}$	$H_{25^{\circ}Ct_{30}}$	$H_{50^{\circ}Ct_0}$	$H_{50^{\circ}Ct_{30}}$	$H_{75^{\circ}Ct_0}$	$H_{75^{\circ}Ct_{30}}$
0	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-

Dans la plupart des cas, aux diverses températures, l'activité est maintenue pour un $DH \leq 6\%$ à l'exception de l'hydrolysat issu du substrat prétraité à $50^{\circ}C$ ($H_{50^{\circ}Ct_{30}}$) et non traité à $75^{\circ}C$ ($H_{75^{\circ}Ct_{30}}$). Lorsque le DH est supérieur à 10% la propriété antimicrobienne a totalement disparu. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la perte de l'activité :

1. les peptides pourraient être utilisés comme source azotée par les bactéries ;
2. la séquence impliquée dans l'expression du potentiel antimicrobien pourrait être endommagée.

Dans le premier cas, la protéolyse aurait un effet pro-microbien, déjà observé pour les hydrolysats de protéines de soja (Hsieh *et al.*, 1999). D'un point de vue physiologique, le potentiel nutritif dépend de la composition peptidique des mélanges issus de la protéolyse. Une proportion majeure des petits peptides favoriserait l'assimilation par les bactéries.

Dans le second cas, la modification de la structure des napines serait aussi responsable de l'altération de l'activité. En effet, il est connu que les caractères amphiphile, cationique et la richesse en hélice α des napines sont fondamentaux pour l'expression du pouvoir antimicrobien (De Souza *et al.*, 2011 ; Ribeiro *et al.*, 2010 ; Ngay *et al.*, 2004). La perte de ces caractéristiques physico-chimiques au cours de la protéolyse, dans les conditions explorées, justifierait l'absence d'activité dans la plupart des hydrolysats.

Ainsi, cette étude a permis de montrer qu'une hydrolyse trop importante anihile le potentiel antibactérien des napines.

3. HYDROLYSE DES NAPINES EN CONDITION ACIDE PAR LA PEPSINE

Dans la première partie de ce chapitre on a montré l'influence du pH et de la température sur le processus de dénaturation des napines. La protéine est manifestement plus sensible à pH basique qu'à pH acide. En effet, dans ces conditions opératoires la protéine présente une haute stabilité structurale. Vu l'influence significative de l'état structural initial de la protéine sur le procédé de protéolyse en condition basique, l'étude sera approfondie en condition acide.

Parmi les protéases les plus utilisées en condition acide, on retrouve la pepsine. L'optimum de son activité se situe à pH 2. Une étude de la cinétique de dénaturation de la protéine à ce pH sera alors effectuée. Par la suite, des hydrolyses de napines ayant subi, ou non, une incubation préalable de 30 mn seront mises en œuvre à trois températures différentes: 25 °C, 50 °C et 75 °C. Les cinétiques de protéolyse et les profils chromatographiques (CLHP-PI) obtenus à chaque température, à partir des napines hydrolysées à des états structuraux différents, seront comparés.

3.1. Effet de la durée d'incubation sur la cinétique de protéolyse

Les résultats du suivi cinétique observés, auparavant, ont mis en évidence la grande stabilité de la protéine en milieu acide. Rappelons qu'une incubation de 30 mn à pH 3 induit un taux de dénaturation maximal de 40 % à 50 °C et 75 °C. Par contre, aucune dénaturation n'est observée à 25 °C (figure 37).

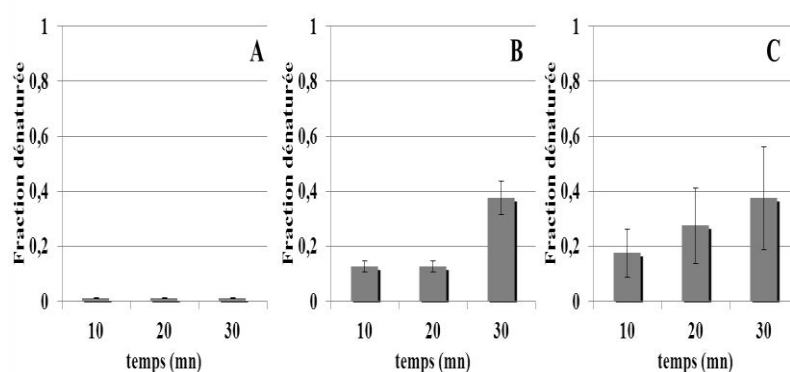


Figure 37. Evolution comparée de la cinétique de dénaturation des napines. Fraction de dénaturation de la protéine à pH 3 aux trois températures suivantes : 25 °C(A), 50 °C (B) et 75 °C (C).

Afin, d'évaluer l'effet de l'état structural initial sur le procédé de protéolyse des napines par la pepsine, une analyse de leur cinétique de dénaturation à pH 2 et aux trois températures, 25 °C, 50 °C et 75 °C (condition optimale d'activité de la protéase) a été réalisée (figure 38 A, B et C).

L'influence de l'état structural de la protéine sur la protéolyse est évaluée par comparaison des cinétiques d'hydrolyse de la protéine ayant subi, ou non, une incubation pendant 30 mn avant l'ajout de la protéase.

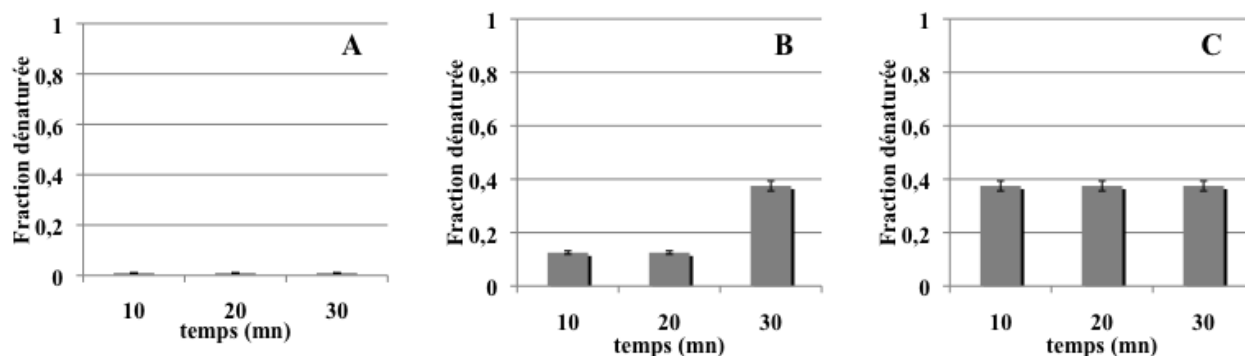


Figure 38. Evolution de la cinétique de dénaturation des napines. Fraction de dénaturation de la protéine à pH 2 aux trois températures suivantes : 25 °C (A), 50 °C (B) et 75 °C (C).

Les cinétiques du procédé ont été suivies pendant 100 mn par la méthode dite du « pH-Stat » avec un ratio enzyme/substrat (E/S) de 4 UA.g⁻¹ de protéine (UA définies par la méthode Anson sur l'hémoglobine). Le degré d'hydrolyse (DH) est exprimé en fonction de la durée de la réaction. La figure 39 montre les courbes des protéolyses obtenues à pH 2 à 25 °C (A), 50 °C (B) et 75 °C (C).

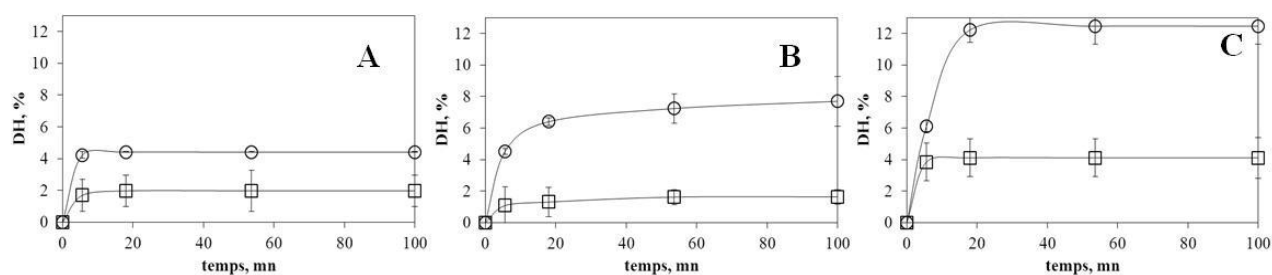


Figure 39. Cinétiques d'hydrolyse enzymatique des napines avec la pepsine à pH 2 et à 25 °C (A), 50 °C (B), 75 °C (C). Réaction avec un substrat non prétraité (○) ou ayant subi préalablement une incubation de 30 mn (□). Conditions opératoires : ratio enzyme / substrat = 4 UA.g⁻¹, concentration initiale en protéine = 10 g.L⁻¹.

Quelles que soient les conditions opératoires, les courbes ont des allures similaires : la réaction évolue pendant les 8 à 10 premières mn, puis se stabilisent par la suite. La haute spécificité de la protéase (acides aminés hydrophobes et aromatiques) est probablement à l'origine de ce comportement. Il est à noter que la durée d'incubation du substrat influence

significativement la cinétique de protéolyse. Quelle que soit la température, le DH diminue : de 4 % à 2 %, à 25 °C, de 7,5 % à 2 %, à 50 °C et enfin de 12 % à 4 %, à 75 °C. Le tableau 8, résume ces résultats. On peut observer qu'une durée d'incubation de 30 mn diminue l'activité de la pepsine. En effet, la protéase est plus active sur les napines non incubées avant la réaction. L'augmentation de la température aussi influence significativement l'activité de la pepsine. De même, la vitesse initiale de la protéolyse, considérée comme étant le nombre de liaisons clivées par heure, est aussi affectée par la dénaturation du substrat. En effet, elle diminue lorsque le substrat subit une incubation préalable.

Les changements structuraux de la protéine pendant cette phase d'incubation (figure 38) peuvent en être la cause. Divers types de modifications peuvent être induits :

1. l'exposition des sites actifs et l'augmentation de l'accessibilité de la protéine à l'action enzymatique (Rehman et Shah, 2005),
2. la formation de ponts disulfure et par conséquent, la stabilisation de la protéine. Les sites actifs qui, alors, se trouvent à l'intérieur, ne sont plus facilement accessibles à la protéase (Wang *et al.*, 2009).

Tableau 8. Influence de l'état structural initial de la protéine sur la cinétique de protéolyse lorsque le substrat est soumis, ou non, à une durée d'incubation avant l'ajout de l'enzyme. Niveau de l'activité de la pepsine : non négligeable (+), notable (++) , important (+++) , diminuée et faible (-), diminuée mais non négligeable (--).

	Condition de protéolyse		
	25 °C	50 °C	75 °C
Sans incubation	+	++	+++
Avec incubation de 30 mn	--	--	-

Il est probable que, pendant la période d'incubation de la protéine, des phénomènes d'agrégation qui favorisent la compacité de sa structure, apparaissent. Ceci pourrait conduire à ce que les sites de clivage préférentiels de la pepsine, de nature hydrophobe, se trouveraient alors enfermés à l'intérieur des napines. Ceci expliquerait la faible efficacité de cette enzyme dans ces conditions opératoires. Des études antérieures (Larré *et al.*, 2006) ont également montré que les napines sont peu dégradées par la pepsine (DH = 3 %). L'effet inhibiteur du traitement thermique du substrat sur l'activité protéolytique était déjà observé sur des

protéines d'origine animale (Cui *et al.*, 2009) et sur des protéines de froment (Wang *et al.*, 2009).

Une nouvelle fois, les résultats montrent que la durée d'incubation du substrat influence la cinétique de protéolyse.

3.2. Effet de la durée d'incubation sur la qualité des mélanges obtenus

Les hydrolysats obtenus à partir des napines prises à différents états de dénaturation ont été analysés par CLHP-PI, afin de déterminer les caractéristiques physico-chimiques (indice d'hydrophobie) des peptides produits. D'après les profils chromatographiques (figure 40) les mélanges varient selon le prétraitement du substrat. Dans le profil A à 25 °C et issu d'hydrolyse des napines non prétraitées (figure 40 A) (DH = 4 %) la portion des napines hydrolysées est plus importante que celui du chromatogramme B (napines incubée 30 mn avec DH = 2%). Ceci est en accord avec les cinétiques de protéolyse précédemment évoquées. Les hydrolysats sont essentiellement élués à un pourcentage d'ACN compris entre 15 % (20 mn) et 30 % (40 mn). Cependant, dans le profil B on remarque une fraction plus importante des peptides de nature plus hydrophile (< 5 % ACN soit < 10 mn).

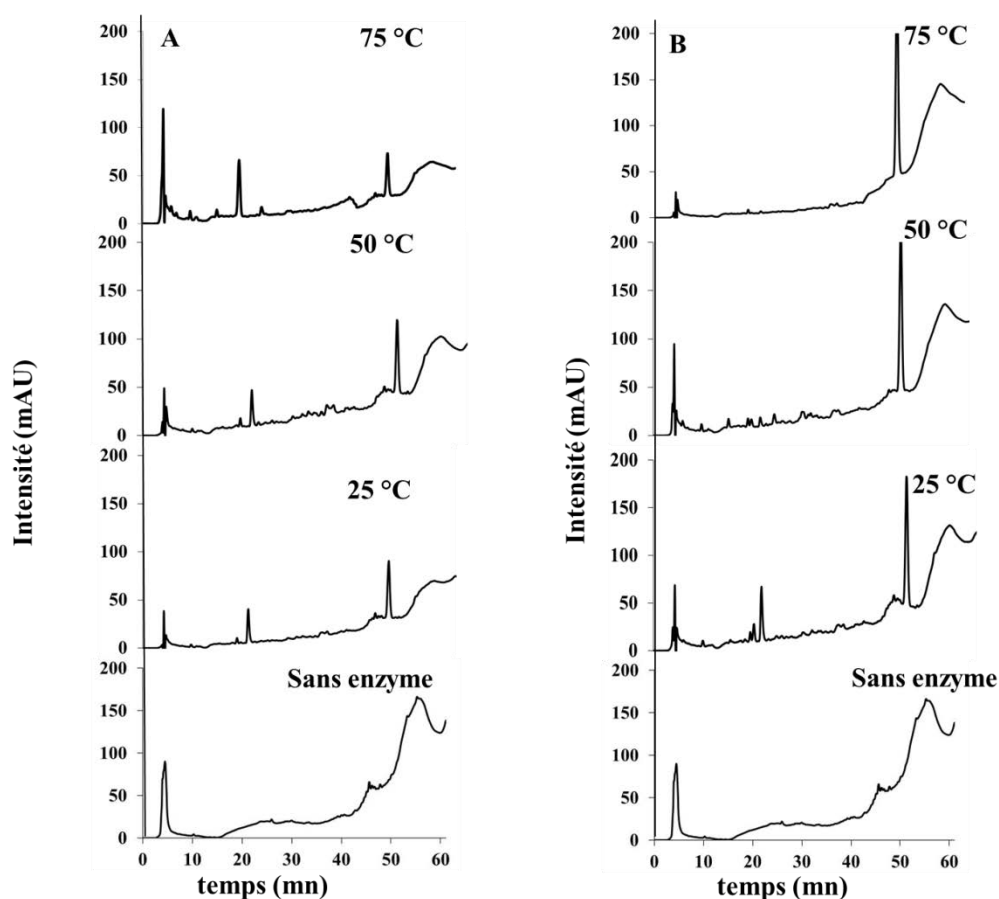


Figure 40. Profils CLHP-PI des hydrolysats obtenus à partir des napines non prétraitées (A) et des napines incubées pendant 30 mn avant l'ajout de l'enzyme (B). Conditions d'hydrolyse pepsique : pH 2, températures = 25 °C, 50 °C et 75 °C. Séparation en CLHP-PI : colonne C₄ (250 mm x 2,1 mm), détection à 226 nm, élution (mélange eau/ACN/TFA (5 / 95 / 0,1 v/v/v) à un débit de 0,2 mL.mn⁻¹.

Le mélange peptidique du chromatogramme obtenu à 50 °C (A) (DH= 7 %) est caractérisé par une proportion de peptides plus hydrophobes (élus entre 10 mn et 40 mn : 10 - 30 % ACN) que celui obtenu à partir des napines incubées à 50 °C (DH= 2%), plus riche en peptides hydrophiles (élus dans les 7 premières mn : 5 % ACN). Le dernier chromatogramme (75 °C, A) est remarquable pour la forte diminution du pic des napines (DH = 12 %) par rapport aux napines incubées pendant 30 mn à 75 °C (DH= 4 %). Ceci se traduit par une proportion peptidique plus importante dans le cas du substrat n'ayant pas subi une période d'incubation avant l'ajout de la protéase.

Ainsi, il est confirmé que l'état de dénaturation du substrat génère des mélanges peptidiques à propriétés physico-chimiques variées.

3.3. Propriétés fonctionnelles des mélanges obtenus

L'effet de l'état structural des napines sur la qualité des mélanges obtenus est ensuite étudié au regard de leurs fonctionnalités. Sachant que l'hydrolyse limitée améliore les propriétés fonctionnelles des protéines (Kunst, 2000), les capacités moussantes et émulsifiantes des protéolysats ont été étudiées.

3.3.1. Propriétés moussantes

Les propriétés moussantes des hydrolysats issus des napines, non prétraitées et préalablement traitées thermiquement (H₂₅ °C, H₅₀ °C et H₇₅ °C) ont été évaluées selon leur capacité à former des mousses. Les mesures du volume de mousse restant dans la solution d'hydrolysat, après un intervalle de temps compris entre 5 mn et 120 mn, ont permis de déterminer la stabilité moussante. Le tableau 9 résume les capacités et stabilités moussantes observées pour nos protéolysats. Il est montré que, quelles que soient les conditions de protéolyse, les hydrolysats possèdent des meilleures capacités moussantes (> 60 %) que la protéine originelle (40 %). Par ailleurs, il est observé que l'incubation du substrat (t₃₀) permet de générer des peptides ayant de meilleures propriétés moussantes. Ceci est probablement lié à leur plus faible DH (Chobert *et al.*, 1996 ; Pedroche *et al.*, 2004 ; Chabanon *et al.*, 2007).

En général, l'activité moussante est favorisée par les hydrolysats avec un 3 % > DH < 9 %, avec un optimum à DH = 5 %. Ces résultats sont en accord avec ceux montrés dans la littérature pour les hydrolysats de colza (Larré *et al.*, 2006 ; Chabanon *et al.*, 2007).

Les peptides de petite taille et plus hydrophiles, obtenus à des DH plus élevés, stabiliseraient moins bien l'interface eau/air que les peptides plus longs et plus hydrophobes (Pedroche *et al.*, 2004). Toutefois, la stabilité des mousses n'est pas améliorée par l'hydrolyse de la protéine.

Tableau 9. Capacité et stabilité moussante des hydrolysats (H_T avec $T= 25\text{ °C}$, 50 °C ou 75 °C) obtenues à partir des napines non prétraitées (t_0) ou prétraitées thermiquement pendant 30 mn (t_{30}).

		Capacité moussante (%)		Stabilité moussante (%)				
		DH (%)		Temps (mn)				
				5	15	30	60	120
Isolat des napines	-	40 ± 3	17 ± 5	17 ± 2	13 ± 6	6 ± 5	6 ± 3	
$H_{25\text{°C}}$	t_0	4	90 ± 4	32 ± 4	16 ± 5	12 ± 3	10 ± 5	8 ± 6
	t_{30}	3	82 ± 5	46 ± 6	12 ± 3	10 ± 3	10 ± 5	8 ± 4
$H_{50\text{°C}}$	t_0	9	60 ± 3	2 ± 1	2 ± 2	2 ± 5	2 ± 1	2 ± 3
	t_{30}	5	90 ± 3	52 ± 6	42 ± 7	40 ± 5	20 ± 8	8 ± 6
$H_{75\text{°C}}$	t_0	13	60 ± 2	52 ± 1	42 ± 4	40 ± 5	20 ± 5	8 ± 7
	t_{30}	5	126 ± 4	88 ± 2	80 ± 8	40 ± 6	38 ± 4	2 ± 5

3.3.2. Propriétés émulsifiantes

La capacité émulsifiante des hydrolysats obtenus a été quantifiée ; elle est résumée dans le tableau 10, qui fait ressortir que les protéines hydrolysées ont une activité émulsifiante supérieure à celle des napines.

Tableau 10. Capacité et stabilité émulsifiantes des hydrolysats (H_T avec $T= 25\text{ °C}$, 50 °C ou 75 °C) obtenues à partir de napines non traitées (t_0) ou préalablement traitées thermiquement pendant 30 mn (t_{30}).

	Isolat des napines	H 25°C		H 50°C		H 75°C	
		t_0	t_{30}	t_0	t_{30}	t_0	t_{30}
DH (%)	-	4	3	9	5	13	5
Activité émulsifiante (%)	14 ± 3	79 ± 3	71 ± 5	21 ± 4	62 ± 8	15 ± 8	86 ± 5
Stabilité émulsifiante (%)	50 ± 3	80 ± 3	50 ± 6	33 ± 1	62 ± 6	50 ± 4	91 ± 3

Cependant, cette augmentation (5,7 fois) est liée au DH (3 % > DH < 9 %). Un DH supérieur à 9 % n'améliore pas l'activité émulsifiante, qui reste inchangée par rapport à celui de la protéine d'origine.

L'étude de Wu et Muir (2008) a montré qu'il existe une corrélation positive entre le caractère hydrophobe et la capacité émulsifiante des protéines. Il est alors possible qu'à faible DH, les peptides de taille variable, soient plus hydrophobes et donc plus efficaces dans la réduction de la tension interfaciale (Krinstinso et Rasco, 2000). De même, la stabilité des émulsions est meilleure pour des faibles valeurs de DH (3-5 %) par rapport à la protéine d'origine. Le tableau 11 résume l'influence de la durée d'incubation sur les propriétés et la stabilité émulsifiantes des hydrolysats.

Tableau 11. Résumé de l'activité et la stabilité émulsifiantes des hydrolysats des napines hydrolysées à différents états de structuration, à trois températures : 25 °C, 50 °C et 75 °C. Les symboles « = » et « + » indiquent respectivement que l'activité est égale ou améliorée par rapport à celle de la protéine entière.

		Condition de protéolyse		
		25 °C	50 °C	75 °C
Activité émulsifiante	Sans incubation	++	+	++
	Avec incubation de 30 mn	++	++	+++
Stabilité émulsifiante	Sans incubation	++	=	+
	Avec incubation de 30 mn	=	++	+++

On observe que dans tous les cas, l'incubation du substrat permet de générer un hydrolysat ayant des meilleures capacités émulsifiantes. Par ailleurs, cette capacité est également favorisée par l'augmentation de la température. De même, les hydrolysats issus des napines préalablement incubées sont plus stables au cours du temps que celle libérées par l'hydrolyse des napines non incubées.

Ces résultats confirment l'importance de la nature du substrat initial (dû au pré-conditionnement de la protéine) pour la génération de peptides aux propriétés fonctionnelles spécifiques.

En résumé

Dans ce chapitre, l'effet de l'état de dénaturation des napines, induit par une durée d'incubation spécifique, sur le procédé d'hydrolyse a été évalué (Figure 40). En particulier, nous avons mis en évidence que ce nouveau paramètre (durée d'incubation) a un effet substantiel sur les cinétiques d'hydrolyse, notamment sur la vitesse de la réaction et/ou le DH maximum atteint, et sur la qualité des mélanges obtenus. Il a été également montré que l'effet du prétraitement du substrat a une influence spécifique suivant la nature de la protéase employée.

L'hydrolyse par l'Alcalase[®] 2,4 L, grâce à sa faible spécificité, permet de générer un mélange peptidique varié ($DH \geq 8 \%$). En général, le prétraitement des napines favorise l'activité de l'enzyme, notamment à 75 °C. Dans de telles conditions le substrat subit des modifications structurales (taux de dénaturation de 40 %) qui favorisent l'accessibilité de l'enzyme aux sites de clivage. En outre, les analyses en CLHP-PI montrent que la durée d'incubation influence aussi le mécanisme d'action de la protéase (« one-by-one » et « zipper ») et donc les peptides libérés. L'évaluation de propriétés biologiques de ces hydrolysats a mis en évidence leur effet sur la croissance des cellules animales de type CHO-AMW. Ces propriétés valorisent les hydrolysats des napines de tourteau de colza dans le secteur pharmaceutique. Par ailleurs, il a été montré que les propriétés antimicrobiennes des napines envers *Bacillus coagulans* disparaissent après hydrolyse enzymatique.

En revanche, la protéolyse par les pepsines est inhibée lorsque le substrat subit une phase d'incubation préalable. La dénaturation de la protéine modifie, en le diminuant, l'accès aux sites de clivage de la pepsine (Wang *et al.*, 2009). L'analyse par CLHP-PI des hydrolysats obtenus montre la présence d'une fraction importante de protéines intactes ainsi qu'un profil peptidique quasiment invariant. La haute spécificité de cette protéase pourrait justifier la faible complexité des mélanges. Toutefois, les peptides générés ont des propriétés fonctionnelles améliorées (moussantes et émulsifiantes) comparées à celles des napines d'origine. Les meilleures propriétés sont atteintes pour les mélanges ayant des valeurs de DH comprises entre 3 et 5 %, libérés par hydrolyse des napines ayant subi une phase d'incubation préalable. Ces propriétés valorisent l'hydrolysat de napines de tourteau de colza dans le secteur alimentaire.

On peut en conclure que l'état de structuration du substrat est un paramètre clé pour la maîtrise du procédé de protéolyse.

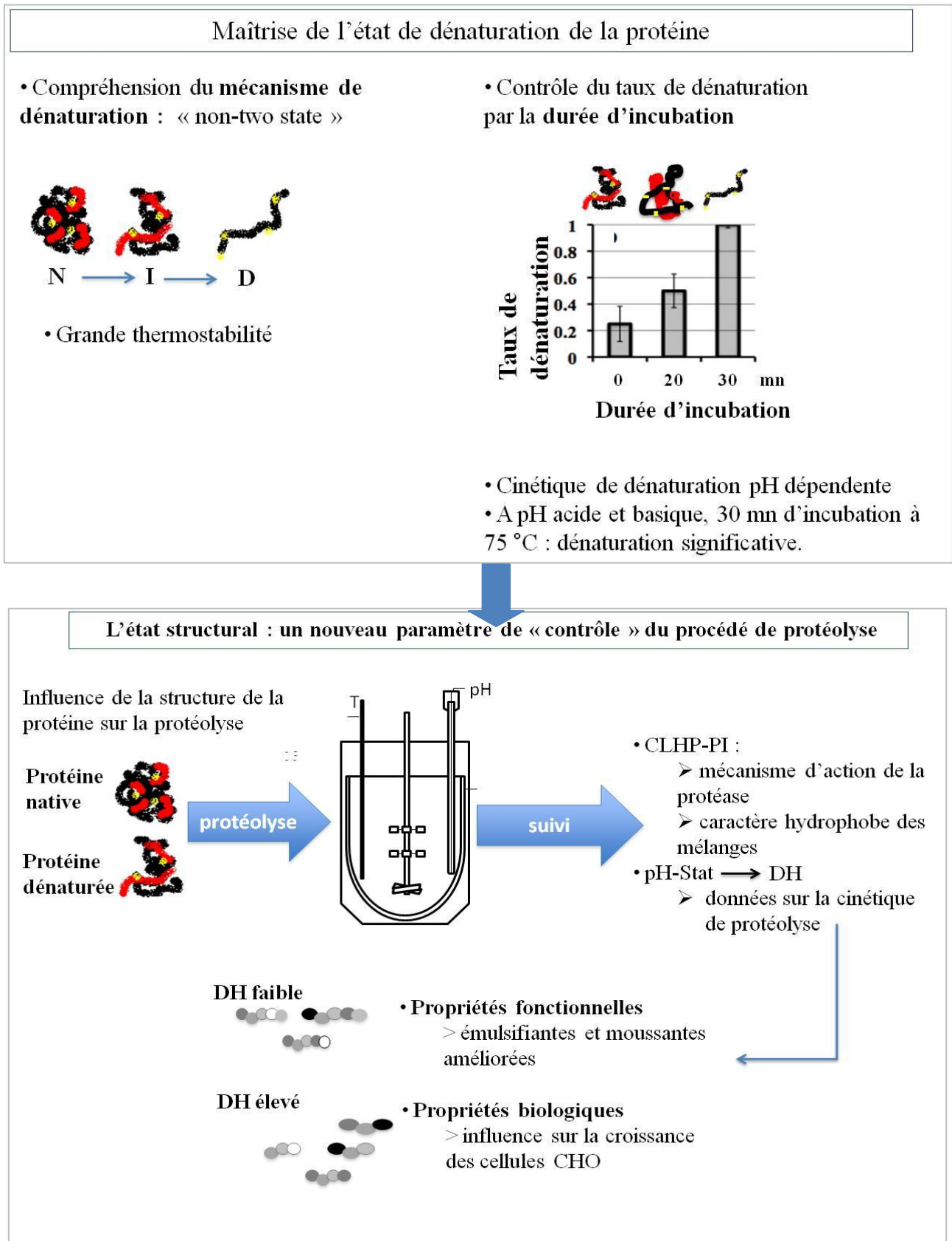


Figure 40. Résumé du chapitre II: « Influence de l'état structural de napines sur la protéolyse enzymatique».

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Conclusion générale

Afin de répondre à la question initialement posée au début de ce manuscrit, « Peut-on maîtriser l'état structural d'une protéine afin d'agir sur la protéolyse, sa cinétique ainsi que les produits de la réaction, tout en améliorant les performances du procédé ou en faisant apparaître des nouvelles fonctionnalités, notamment au niveau des activités biologiques des hydrolysats ? », nous avons choisi une protéine-substrat, les napines présentes dans le tourteau de colza, et nous nous sommes fixé trois objectifs principaux :

- le premier étant de proposer un procédé d'extraction-purification des napines permettant de produire un unique lot de napines, utilisable tout au long de la thèse, selon une approche d'éco-conception ;
- le deuxième ayant pour but de qualifier et de quantifier l'impact des conditions de dénaturation des napines obtenues, par modification des paramètres de température et pH, sur leur état structural ;
- le troisième étant destiné à l'étude de l'influence de la structure plus ou moins modifiée des napines sur la cinétique de la protéolyse enzymatique, sur la nature des peptides libérés et sur les fonctionnalités biologiques et physico-chimiques des hydrolysats produits.

Les principales contributions du travail exposé dans ce mémoire, synthétisées au travers de la figure 41, concernent l'ensemble des objectifs précédemment décrits et sont résumées ci-après.

Obtention de la protéine-substrat : optimisation du procédé d'extraction et de purification des napines issues d'un tourteau de colza industriel.

Une étude préliminaire a permis de définir les paramètres les plus influents sur les performances du procédé d'extraction des napines et de mettre en exergue la possibilité d'une extraction sélective à pH acide de la protéine ciblée dans cette étude. Grâce à une approche d'optimisation multicritère basée, au final, sur le génie décisionnel, nous avons identifié les conditions d'extraction optimisées qui sont les suivantes : pH = 2, ratio eau/ tourteau = 13 % , température = 57 °C et durée d'extraction = 15 mn. Ces conditions opératoires améliorent non seulement les performances quantitatives d'extraction (concentration en napines sélectivement extraites (2,5 g.L⁻¹), pureté en napines (9,8 %) et rendement d'extraction (11 %)), mais aussi les critères économiques liés au procédé (consommation d'acide

chlorhydrique). Par ailleurs, le procédé d'extraction sélectif mis en œuvre a permis de faciliter le procédé de purification subséquent. En effet, seules deux étapes de purification ont été nécessaires pour obtenir l'isolat de napines : une première étape d'enrichissement par précipitation au sulfate d'ammonium et une deuxième de chromatographie liquide basse pression d'exclusion stérique (CLBP-ES). Une analyse en dichroïsme circulaire a montré une structure riche en hélice α (37 %), ce qui est en accord avec la bibliographie (Jyothi *et al.*, 2007). Il a donc pu être conclu que les conditions d'extraction / purification mises en œuvre n'endommageaient en rien la structure de la protéine.

Ultérieurement, ce procédé d'extraction et de purification, initialement réalisé à l'échelle du laboratoire, a pu être extrapolé à plus grande échelle. Dans ce cas, en vue de s'affranchir de trop importantes quantités de sels qui auraient été nécessaires à l'extrapolation de la précipitation précédemment décrite, la concentration de l'extrait par technologie membranaire a été préférée. Cette dernière a permis d'augmenter le rendement de cette première étape de purification ($\eta = 90\%$ contre $\eta = 66\%$ précédemment) tout en s'inscrivant dans le contexte actuel de développement durable.

Par ailleurs, des activités, antimicrobienne à l'encontre *Bacillus coagulans*, contaminant alimentaire, et antifongique envers *Fusarium langsethiae*, pathogène des cultures de la filière orge-malt-bière des napines ainsi produites, ont été validées. De ce fait, l'application des napines de tourteau de colza peut être envisagée dans le secteur de la sécurité alimentaire et phytosanitaire. Ces résultats présentent donc la potentialité d'accroître la valorisation du co-produit de l'industrie oléifère.

Etude de l'état structural « contrôlé » des napines sous contrainte du couple pH / température : prise en compte d'une phase dite d'incubation.

Une étude de l'impact des paramètres physico-chimiques sur la stabilité et la cinétique de dénaturation de la protéine a alors été mise en place. Nous avons pu démontrer que les napines possèdent une structure stable, dont la résistance à température élevée s'est révélée pH-dépendante : 65 °C à pH basique et 115 °C à pH acide. Par la suite, un suivi cinétique de l'effet synergique du pH et de la température au cours du temps a permis de faire émerger la « durée d'incubation » en tant que facteur clé pour la dénaturation de la protéine. Les napines sont alors soumises à un conditionnement (couple pH / T) de durée variable. Pour chacune des conditions opératoires étudiées, une durée d'incubation relativement courte ($t = 30$ mn) est apparue suffisante pour induire des modifications structurelles variées. Ainsi, la phase

d'incubation a pu être considérée comme un paramètre de maîtrise de l'état de dénaturation de la protéine.

Etude de l'influence de la structure initiale des napines sur le procédé de protéolyse enzymatique et sur ses conséquences.

La durée et les conditions (couple pH / température) d'incubation, définies précédemment comme un paramètre de contrôle de la variabilité structurale de la protéine, ont permis l'étude des conséquences de la structure initiale du substrat sur le déroulement de la protéolyse.

La comparaison des cinétiques de protéolyse de napines ainsi sélectivement dénaturées, et de napines non incubées (référence), a montré que l'état structural initial influence le procédé de protéolyse en termes de vitesse initiale de réaction et/ou de degré d'hydrolyse maximum atteint.

L'analyse chromatographique (CLHP-PI) des mélanges libérés a aussi mis en évidence que le mécanisme hydrolytique de la protéase (one-by-one ou zipper) est influencé par l'état initial du substrat. Cette démarche a permis l'obtention de produits possédant différentes propriétés physico-chimiques. Afin d'améliorer la compréhension du lien entre ces propriétés et la potentialité des peptides libérés, une étude des propriétés biologiques et fonctionnelles a été engagée. Les conditions opératoires d'incubation ayant été maintenues au cours de protéolyses ultérieures, la sélection de protéases appropriées a été nécessaire : utilisation de l'Alcalase[®] 2,4L en condition basique et de la pepsine en condition acide.

Les peptides libérés suite à l'hydrolyse par l'Alcalase[®] 2,4L ont montré une influence sur la croissance de cellules animales productrices d'anticorps (CHO) cultivées en milieu sans sérum. En outre, le degré d'impact sur la croissance s'est révélé dépendant des conditions opératoires au niveau de la protéolyse (durée d'incubation pre-hydrolyse à pH 9 et 75 °C et température). L'alternative possible à l'utilisation de sérum ainsi démontrée constitue un intérêt significatif pour l'industrie pharmaceutique. Par contre, l'activité antimicrobienne envers *Bacillus coagulans*, observée avec les napines, est perdue suite à la protéolyse.

Quant aux produits issus de l'hydrolyse pepsique, leurs capacités moussantes et émulsifiantes ont été étudiées. Ces tests d'activités fonctionnelles ont également montré une influence majeure de l'état structural initial du substrat (via le degré d'hydrolyse atteignable pour chacune des conditions étudiées) sur les dites propriétés résultantes.

Ces études ont ainsi permis de mettre en évidence que la production de peptides est réalisable par la maîtrise de l'état structural initial du substrat.

Améliorer la compréhension et la maîtrise du procédé de protéolyse enzymatique contrôlé par l'état structural de la protéine substrat



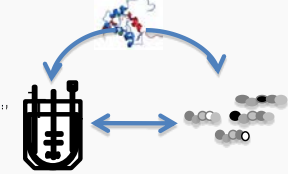
Tache	Approche	Résultat
<p>1) Obtention de la protéine substrat: les napines</p> 	<p>Mise en œuvre et optimisation du procédé d'extraction S/L et purification de la protéine issus d'un tourteau de colza industriel</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Condition optimal d'extraction: pH 2; tourteau/eau 13 %; 57 °C; 15 mn; ✓ Procédé de purification extrapolé à l'échelle pilote en 2 étapes: UF et CLBP-ES ✓ Validation propriétés antifongiques envers <i>Fusarium langsethiae</i>
<p>2) Contrôle de l'état de structuration des napines par la durée d'incubation</p> 	<p>Evaluation (1) du mécanisme de dénaturation de la protéine, (2) de la stabilité thermique et (3) des paramètres le plus influentes sur la cinétique de dénaturation de la protéine</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dénaturation en plusieurs étapes : « non-two state » ✓ Haute stabilité thermique (pH 2= 115 °C; pH 11=65 °C) ✓ Cinétique de dénaturation pH/T dépendant ✓ Dénaturation variable pour un temps d'incubation < 30 mn
<p>3) Contrôle du procédé de protéolyse par l'état des structuration des napines</p> 	<p>Suivi et comparaison de la cinétique de protéolyse et des qualités des mélanges obtenus issus des napines à différents état de structuration</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Influence sur le la cinétique de protéolyse ✓ Influence sur le mécanisme d'action de la protéase donc des mélanges obtenus ✓ Validation propriétés biologiques des différents mélanges (influence sur la croissance des cellules animales, propriétés fonctionnelles)

Figure 41. Schéma des résultats principaux de la thèse.

Perspectives

L'étude réalisée a permis de mettre en évidence la potentialité d'une valorisation accrue du co-produit de l'industrie oléifère, le tourteau de colza et plus particulièrement les napines. Néanmoins, pour satisfaire les contraintes d'une étude rigoureuse, il a été nécessaire d'utiliser un lot unique de napines extraites d'un seul et même tourteau. Ceci peut, a contrario,

poser le problème de la reproductibilité sur l'utilisation de lots différents de tourteaux et de napines extraites. Par conséquent, il serait alors nécessaire de valider la possibilité d'extrapolation du procédé à des tourteaux de colza d'origines différentes, voire à l'ensemble des co-produits riches en albumines végétales issues de divers oléagineux. De plus, la validation du potentiel antimicrobien des napines sur d'autres microorganismes pathogènes (*Salmonella*) et de micro-organismes générant des toxines (*Staphylococcus*, *Bacillus*, *Fusarium*, etc.) pourrait permettre d'élargir les potentialités de valorisation de ce co-produit. La généralisation de l'approche proposée, avec d'autres « substrats », consistant à imposer une durée d'incubation des napines, préalablement mise en place à leur hydrolyse, permettrait de valider, sans retenue, ce nouveau paramètre innovant, pour le contrôle du procédé de protéolyse, reposant sur la maîtrise de l'état structural initial de la protéine-substrat. La généralisation de l'efficacité de cette approche à d'autres familles de protéines d'intérêt pourrait être envisagée. Dans cette optique, des méthodes de modélisation structurale pourraient être utilisées pour définir des outils prédictifs de protéolyse ciblée liés à l'état structural initial du substrat.

De surcroît, les propriétés biologiques et fonctionnelles ont été étudiées à partir d'hydrolysats complexes de napines. Etant donné le lien démontré entre les propriétés physico-chimiques des peptides et leurs activités associées, il serait nécessaire d'identifier plus précisément les fractions peptidiques impliquées. Ainsi, des travaux ultérieurs consacrés à la mise en place d'une stratégie rationnelle de séparation et d'identification de ces peptides apporteraient une meilleure compréhension des phénomènes observés. Pour se faire, le couplage de techniques analytiques de chromatographie liquide (phase inverse ou non) associées à la spectrométrie de masse permettrait d'obtenir des informations par rapport à l'hydrophobie, l'hydrophilie et la charge globale du mélange peptidique. L'ensemble des informations physico-chimiques des mélanges ainsi obtenu pourrait être utilisé pour la définition de cartes peptidiques associées aux propriétés induites. La caractérisation de la composition des hydrolysats obtenus par un procédé de protéolyse maîtrisé, ainsi que de leurs activités résultantes, serait alors un outil clé pour la production de peptides d'intérêt. Une telle identification permettrait non seulement de réduire le spectre des matières premières envisageables, mais aussi de cibler plus rapidement les fractions d'intérêt pouvant résulter d'une protéolyse enzymatique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abell BM, Hahn M, Holbrook LA, Moloney MM (2004). Membrane topology and sequence requirements for oil body targeting of oleosin. *The Plant Journal* 37 (4): 461-470.

Adje EY, Balti R, Kouach M, Dhulster P, Guillochon D, & Nedjar-Arroume N (2011). Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules* 49 (2): 143–153.

Adje EY, Balti R, Kouach M, Guillochon D, & Nedjar-Arroume N (2011). α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *European Food Research and Technology* 232 (4): 637–646.

Adler-Nissen J (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. *Elsevier Applied Science Publishers*.

Adler-Nissen J (1987). Newer uses of microbial enzymes in food processin. *Trends in Biotechnology* 5, n°.6 : 170–174.

Agizzio AP, Da Cunha M, Carvalho AO, Oliveira MA, Ribeiro SFF, & Gomes VM (2006). The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant Science* 171 (4): 515–522.

Aider M, & Barbana C (2011). Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review. *Trends in Food Science Technology* 22 (1): 21–39.

Aluko RE, McIntosh T, & Katepa-Mupondwa F (2005). Comparative study of the polypeptide profiles and functional properties of *Sinapis alba* and *Brassica juncea* seed meals and protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (11): 1931–1937.

Amiot J. A, Germain L, Turgeon S, Lemay M, Ory-Salam C, & Auger AF (2004). Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *International Dairy Journal* 14 (7): 619–626.

AMSOL (2001). Dossier: Point colza 2001.

AOAC (1984). Official methods of analysis, 14th ed. In: Association of Official Analytical Chemist, Arlington.

Arifin B, Bono A, Farm YY, Ling ALL, & Fui SY (2009). Protein Extraction from Palm Kernel Meal. *Journal of Applied Sciences* 9 (17): 2996–3004.

Aschi A, Mbarek N, Othman M, & Gharbi A (2008). Study of thermally and chemically unfolded conformations of bovine serum albumin by means of dynamic light scattering. *Materials Science and Engineering: C*, 28 (5): 594–600.

B

- Banga JR, Balsa-Canto E, Moles CG, & Alonso A (2003).** Improving food processing using modern optimization methods. *Trends in Food Science & Technology* 14 (4): 131–144.
- Barciszewski J, Maciej S, & Haertlé T (2000).** Minireview: Analysis of Rape Seed Napin Structure and Potential Roles of the Storage Protein. *Journal of Protein Chemistry* 19 (4): 249–254.
- Baszczynski CL, & Fallis L (1990).** Isolation and nucleotide sequence of a genomic clone encoding a new *Brassica napus* napin gene. *Plant Molecular Biology* 14 (4): 633–635.
- Baudet BP, & Evrard J (1998).** Tourteau à basse teneur en glucosinolates (BTG). *Cahier technique colza*, CETIOM.
- Bautista JB, Hernandez-Pinzon I, Alaiz M, Parrado J, & Millan F (1996).** Low molecular weight sunflower protein hydrolysate with low concentration in aromatic amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : 44 (4): 967–971.
- Beasley D, Bull DR, & Martin RR (1993).** A Sequential Niche Technique for Multimodal Function Optimization. *Evolutionary Computation* 1 (2): 101–125.
- Bell JM (1993).** Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. *Canadian Journal of Animal Science* 73 (4): 689–697.
- Bérot S, Compoin JP, Larré C, Malabat C, & Guéguen J (2005).** Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.). *Journal of Chromatography B* 818 (1): 35–42.
- Berot S, Popineau Y, Compoin JP, Blassel C, & Chaufer B (2001).** Ultrafiltration to fractionate wheat polypeptides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 753 (1): 29–35.
- Biziulevičius GA, Kislukhina OV, Kazlauskaitė J, & Žukaitė V (2006).** Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a ‘cause and effect’ theory of bifunctionality. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 46 (1): 131–138.
- Bjurlin MA, Bloomer S, & Nelson CJ (2002).** Characterization of proteolytic activity of proteases. *Biotechnology Letters* 24 (3): 191–195 (5).
- Blatt FJ (1968).** Physics of Electronic Conduction in Solids (1st Ed.). McGraw-Hill.
- Blom W, Kunst A, Hakkaart M, Luli G, & Van Schie B (1996).** Peptides for Tissue and Cell Culture Media. PCT C12N 5/02, WO 96/26266.
- Bos C, Airinei G, Mariotti F, Benamouzig R, Bérot S, Evrard J, Fénart E, Tomé D, & Gaudichon C (2007).** The Poor Digestibility of Rapeseed Protein Is Balanced by Its Very High Metabolic Utilization in Humans. *The Journal of Nutrition* 137 (3): 594–600.

- Bouhallab S, & Henry G (1995a).** Transmission of a hydrophobic peptide through an inorganic ultrafiltration membrane: effect of membrane support. *Journal of Membrane Science* 104 (1-2): 73–79.
- Bouhallab S, & Henry G (1995b).** Enzymatic hydrolysis of sodium caseinate in a continuous ultrafiltration reactor using an inorganic membrane. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42 (5): 692–696.
- Box GEP, & Draper NR (1987).** Empirical model-building and response surfaces. Oxford, England: John Wiley & Sons.
- Brune M, Hallberg L, & Skaanberg AB (2006).** Determination of Iron-Binding Phenolic Groups. *Foods Journal of Food Science* 56 (1): 128–131.
- Burel C, Boujard T, Escaffre AM, Kaushik SJ, Boeuf G, Mol KA, Van der Geyten S, & Kühn ER (2000).** Dietary low-glucosinolate rapeseed meal affects thyroid status and nutrient utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 83 (06): 653–664.

C

- Cameron JJ, & Myers CD (1983).** Rapeseed protein isolate. Brevet n° 4418013; U.S. Classification: 530/377. International Classification: A23J 114. General Foods, Inc. United States.
- Carlson R. (2001).** Design of Experiments, Principles and Applications. *Journal of Chemometrics* 15 (5): 495–496.
- Chabanon G, Alves da Costa L, Farges B, Harscoat C, Chenu S, Goergen JL, Marc A, Marc I, & Chevalot I (2008).** Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresource Technology* 99 (15): 7143–7151.
- Chabanon G, Chevalot I, Framboisier X, Chenu S, & Marc I (2007).** Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry* 42 (10): 1419–1428.
- Chen ZY, Peng C, Jiao R, Wong YM, Yang N, & Huang Y (2009).** Anti-hypertensive Nutraceuticals and Functional Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (11): 4485–4499.
- Chobert JM, Bertrand-Harb C, & Nicolas MG (1988).** Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36 (5): 883–892.
- Chobert JM, Briand L, Guéguen J, Popineau Y, Larré C, & Haertlé T (1996).** Recent advances in enzymatic modifications of food proteins for improving their functional properties. *Food/Nahrung* 40 (4): 177–182.

- Clemente A (2000).** Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 11 (7): 254–262.
- Clemente A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Pedroche J, Bautista J, & Millán F. (1999).** Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum L.*) protein hydrolysates. *Food Chemistry* 67 (3): 269–274.
- Coelho L (2010).** Gaussian quantum-behaved particle swarm optimization approaches for constrained engineering design problems. *Expert Systems with Applications* 37 (2): 1676-1683.
- Conejero L, Sánchez-Ruiz FJM, Mateo PL, Burgos FJ, Vendrell J, & Avilés FX (1991).** Differential Scanning Calorimetric Study of Carboxypeptidase B, Procarboxypeptidase B and Its Globular Activation Domain. *European Journal of Biochemistry* 200 (3): 663–670.
- Cooper A. (2000).** Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. *Biophysical Chemistry* 85: 25–39.
- Cui C, Zhou X, Zhao M, & Yang B. (2009).** Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10 (1): 37–41.

D

- Dalgalarondo M (1986).** Contribution à l'étude des caractéristiques physico-chimiques des protéines des graines de Tournesol (*Hélianthus annuus L.*) et de Colza (*Brassica napus L.*). *Travaux de thèse*. 178 pp.
- Damodaran S (2005).** Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science* 70 (3): R54–R66.
- De Souza C, Pinto MFS, Pelegrini PB, Lima TB, Silva ON, Pogue R, Grossi-de-Sá MF, & Franco OL (2011).** Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal* 25 (10): 3290–3305.
- Deléage G, Geourjon C (1993).** An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Computer Application in the Bioscience*, 9 : 197-199.
- Dewulf J, Van Langenhove H, & Van De Velde B (2005).** Exergy-Based Efficiency and Renewability Assessment of Biofuel Production. *Environmental Science & Technology* 39 (10): 3878–3882.
- Dietz A, Azzaro-Pantel C, Pibouleau L. & Domenech S(2006).** Multiobjective optimization for multiproduct batch plant design under economic and environmental considerations. *Computers & Chemical Engineering* 30 (4): 599–613.

Diniz FM, & Martin AM (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science & Technology* 31 (5): 419–426.

Diosady LL, Tzeng YM, & Rubin LJ (1984). Preparation of Rapeseed Protein Concentrates and Isolates Using Ultrafiltration. *Journal of Food Science* 49 (3): 768–770.

E

Eftink MR, & Shastry MC (1997). Fluorescence methods for studying kinetics of protein-folding reactions. *Methods in enzymology* 278: 258–286.

Epand RM, & Vogel HJ (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1462 (1-2): 11–28.

F

Farges-Haddani B, Tessier B, Chenu S, Chevalot I, Harscoat C, Marc I, Goergen JL, & Marc, A (2006). Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochemistry* 41 (11): 2297–2304.

Firatligil-Durmus E, & Evranuz O (2010). Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *LWT-Food Science and Technology* 43(2): 226–231.

Fonseca CM, & Fleming PJ (1993). Genetic Algorithms for Multiobjective Optimization: Formulation, Discussion and Generalization.

Franek F (2004). Gluten of spelt wheat (*Triticum aestivum* subspecies *spelta*) as a source of peptides promoting viability and product yield of mouse hybridoma cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (13): 4097–4100.

Franek F, Hohenwarter O, & Katinger H (2000). Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnology progress* 16 (5): 688–692.

Freire E, & Biltonen RL (1978). Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application to homogeneous systems. *Biopolymers* 17 (2): 463–479.

Friedman, M., & Brandon D.L. (2001). Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 49 (3): 1069–1086.

Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, Vercaigne-Marko D, Kosciarz E, Ruckebusch C, Dhulster P, Guillochon D (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS letters* 491 (1): 159–163.

G

Geoffrion AM, Dyer JS, & Feinberg A (1972). An Interactive Approach for Multi-Criterion Optimization, with an Application to the Operation of an Academic Department. *Management Science* 19 (4-Part-1): 357–368.

Ghodsvali A, Khodaparast MHH, Vosoughi M, & Diosady LL (2005). Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties. *Food Research International* 38 (2): 223–231.

Gill I, Lopez-Fandino R, Jorba X, & Vulfson EN (1996). Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology* 18 (3): 162–183.

Godon B (1985). Protéines végétales. *Technique et documentation*. Lavoisier.

Godon G. (1996). Protéines végétales. Eds Lavoisier, (Chapter VI).

Goldberg DE, & Holland JH (1988). Genetic Algorithms and Machine Learning. *Machine Learning* 3 (2) : 95–99.

Goldberg DE, & Samtni MP (1991). Engineering optimization via the genetic algorithms. *Computers and Structures* 40: 1321–1327.

Gonçalves N, Vioque J, Clemente A, Sánchez-Vioque R, Bautista J, & Millán F (2010). Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza. *Grasas y Aceites* 48 (5): 282–289.

Graser G, Oldham NJ, Brown PD, Temp U, & Gershenzon J (2001). The biosynthesis of benzoic acid glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 57: 23–32.

Grinberg VY, Burova TV, Haertlé T, & Tolstoguzov VB (2000). Interpretation of DSC data on protein denaturation complicated by kinetic and irreversible effects. *Journal of biotechnology* 79 (3): 269–280.

Gruener L, & Ismond MAH (1997). Effects of acetylation and succinylation on the functional properties of the canola 12S globulin. *Food Chemistry* 60 (4): 513–520.

Guéguen J, Popineau Y, Anisimova IN, Fido RJ, Shewry PR, & Tatham AS (1996). Functionality of the 2S Albumin Seed Storage Proteins from Sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (5): 1184–1189.

Gunstone FD (2001). Production and consumption of rapeseed oil on a global scale. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103 (7): 447–449.

Guo X, Shaojun T, & Small DM (2010). Generation of meat-like flavourings from enzymatic hydrolysates of proteins from Brassica sp. *Food Chemistry* 119 (1): 167–172.

H

Hamada JS (1992). Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (5): 719–723.

Higgins TJV, Spencer D, Dove H, Freer M & Coombe JB (1985). Rumen degradation of individual proteins in oil seeds and legume grains.(Conference paper). *Proceedings of the Nutrition Society of Australia* vol. 10.

Horton HR, Moran LA, Ochs RS, Rawn JD, & Scrimgeour KJ (2000).Principes de biochimie. Ed. De Boeck Université.

Hsieh CM, Yang FC, Iannotti EL (1999). The effect of soy protein hydrolyzates on fermentation by Lactobacillus. *Process Biochemistry* 34 (2): 173-179.

Huang AH (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiology* 110 (4): 1055–1061.

Huang CC, Liang WY, Lin SH, Tseng TL, & Chiang HY (2011).A rough set based approach to patent development with the consideration of resource allocation. *Expert Systems with Applications* 38 (3): 1980–1992.

Hudson BJF (1994). New and Developing Sources of Food Proteins.Ed. Springer.

I

ISO 14502-1: 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent

J

Jang A, & Lee M (2005). Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat science* 69 (4): 653–661.

Jyothi TC, Singh SA, & Appu Rao AG (2007). Conformation of Napin (Brassica juncea) in Salts and Monohydric Alcohols: Contribution of Electrostatic and Hydrophobic Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(10): 4229–4236.

K

- Kapel R, Klingenberg F, Framboisier X, Dhulster P, & Marc I (2011).** An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultrafiltration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide. *Journal of membrane science* 383 (1-2): 26–34.
- Kapel R, Rahhou E, Lecouturier D, Guillochon D, & Dhulster P (2006).** Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochemistry* 41 (9): 1961–1966.
- Keen KJ, & Rapson NT (1995).** Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology* 17 (3): 153–163.
- Kelly SM, & Price NC (2000).** The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current protein & peptide science* 1 (4): 349–384.
- Kelly SM, Jess TJ, & Price NC (2005).** How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta*, 1751 (2), 119–139.
- Kilara A, & Panyam D. (2003).** Peptides From Milk Proteins and Their Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43 (6): 607–633.
- Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, Hahm KS, & Park Y (2009).** Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *International Journal of Molecular Sciences* 10(6): 2860–2872.
- Kinsella JE (1989).** *Advances in Food and Nutrition Research*. Ed. Academic Press.
- Kristinsson HG, & Rasco BA (2000).** Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (3): 657–666.
- Kroll J, Kujawa M, & Schnaak W (1991).** Preparation of Rapeseed Proteins by Extraction, Ultrafiltration and Diafiltration. *European Journal of Lipid Science and Technology* 93 (2): 61–65.
- Kumoro AC, Sofiah S, Aini N, Retnowati DS, & Budiayati CS (2012).** Effect of temperature and particle size on the alkaline extraction of protein from chicken bone waste. *Reaktor* 13 (2): 124–130.
- Kunst A. (2000).** Enzymatic modification of soy proteins to improve their functional properties. *Industrial Proteins* 8 (3): 9–11.

L

- Lacroix M, Amiot J, & Brisson GJ (1983).** Hydrolysis and Ultrafiltration Treatment to Improve the Nutritive Value of Rapeseed Proteins. *Journal of Food Science* 48 (6): 1644–1645. .
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680–685.
- Lahl J Lahl W, & Braun DS (1994).** Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food technology (Chicago)* 48 (10): 68–71.
- Larré C, Mulder W, Sanchez-Vioque R, Lazko J, Bérot S, Guéguen J, & Popineau Y (2006).** Characterization and foaming properties of hydrolysates derived from rapeseed isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 49 (1): 40–48.
- Lati E, Dauphin C, Hamon M, & Silvestre M (1992).** Comportement de mélanges d'acides aminés et de peptides vis-à-vis du cuivre (II): Application à l'analyse d'hydrolysats de caséine. *Analytica Chimica Acta* 268 (1): 163–169.
- Lee SW, Shimizu M, Kaminogawa S, & Yamauchi K (1987).** Emulsifying Properties of Peptides Obtained from the Hydrolyzates of β -Casein (Food & Nutrition). *Agricultural and Biological Chemistry* 51 (1): 161–166.
- Lemarié J, De Looze, MA, & Rivaud D (1996).** Protéines de colza: quels usages industriels? *Oleoscope* 36 : 9–18.
- Lemieux L, Piot J, Guillochon D, & Amiot J. (1991).** Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *Chromatographia* 32 (11): 499–504.
- Lepock JR, Rodahl AM, Zhang C, Heynen ML, Waters B, & Cheng KH (1990).** Thermal denaturation of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains. *Biochemistry* 29 (3): 681–689.
- Leprince O, van Aelst AC, Pritchard HW, & Murphy DJ (1997).** Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and -sensitive oilseeds. *Planta* 204 (1) : 109–119.
- Liener IE (1994).** Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34 (1): 31–67.
- Lin P, & Ng TB (2008).** A novel and exploitable antifungal peptide from kale (*Brassica alboglabra*) seeds. *Peptides* 29 (10): 1664–1671.

M

- Ma Y, & Xiong YL (2009).** Antioxidant and Bile Acid Binding Activity of Buckwheat Protein in Vitro Digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (10): 4372–4380.
- Magalas LB, & Malinowski T (2003).** A New Multifunctional Subresonant and Resonant Mechanical Spectrometer. *Solid State Phenomena* 89: 349–354.
- Mahmoud MI (1994).** Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food technology* 48: 89–95.
- Maldonado J, Gill A, Narbona E, Molina AJ, Bayers R, & Campoy C. (1998).** Special formulas in infant nutrition: a review. *Early human development* 53: S23–S32.
- Mandal S, Kundu P, Roy B, & Mandal RK (2002).** Precursor of the Inactive 2S Seed Storage Protein from the Indian Mustard *Brassica juncea* Is a Novel Trypsin Inhibitor. Characterization, post-translational processing studies, and transgenic expression to develop insect-resistant plants. *Journal of Biological Chemistry* 277 (40): 37161–37168.
- Mannheim A, & Cheryan M (1990).** Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *Journal of Food Science* 55 (2): 381–385.
- Maouche S, Bounsaythip CK, & Roussel G (2000).** Optimisation du placement des formes irrégulières. *Techniques de l'ingénieur. Informatique industrielle* S1 (S7212):S7212.1–S7212.17.
- Margot A, Flaschel E, & Renken A (1997).** Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Process Biochemistry* 32 (3): 217–223.
- Mariscal-Landín G, Reis de Souza TC, Parra JES, Aguilera A, & Mar B. (2008).** Ileal digestibility of protein and amino acids from canola meal in weaned piglets and growing pigs. *Livestock Science* 116 (1): 53–62.
- Massebeuf S, Fonteix C, Hoppe S, & Pla F. (2003).** Development of new concepts for the control of polymerization processes: Multiobjective optimization and decision engineering. I. Application to emulsion homopolymerization of styrene. *Journal of Applied Polymer Science* 87 (14): 2383–2396.
- Mc Kevith B. (2005).** British Nutrition Foundation, *Nutrition Bulletin* 30:13-26
- Megias C, Pedroche J, Yust M, Alaiz M, Giron-Calle J, Million F, & Vioque J (2009).** Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification. *LWT - Food Science and Technology* 42 (1): 228–232.
- Meisel H (1997).** Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Peptide Science* 43 (2): 119–128.

Monsalve RI, & Rodriguez R (1990). Purification and characterization of proteins from the 2S fraction from seeds of the Brassicaceae Family. *Journal of Experimental Botany* 41 (1): 89–94.

Monsalve RI, Villalba M, López-Otín C, & Rodríguez R (1991). Structural analysis of the small chain of the 2S albumin, napin nIII, from rapeseed. Chemical and spectroscopic evidence of an intramolecular bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta- Protein Structure and Molecular Enzymology* 1078 (2): 265–272.

Morato A, & Junqueira RJ, (2000). Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides □: Use of subtilisin and trypsin. *Journal of food composition and analysis (Print)* 13 (5): 843–857.

Moreno FJ, Mellon FA, Wickham MSJ, Bottrill AR, & Mills ENC (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal* 272 (2): 341–352.

Mosser M, Kapel R, Aymes A, Bonanno LM, Olmos E, Chevalot I, Marc I, & Marc A (2012). Chromatographic fractionation of yeast extract: A strategy to identify physicochemical properties of compounds promoting CHO cell culture. *Process Biochemistry* 47 (7): 1178–1185.

Moure A, Sineiro J, Dominguez H, & Parajò JC (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International* 39 (9): 945–963.

Mullally MM, O'Callaghan DM, FitzGerald RJ, Donnelly WJ, & Dalton JP (1994). Proteolytic and Peptidolytic Activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolyzate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (12): 2973–2981.

Muniglia L, Nandor Kiss L, Fonteix C, & Marc I (2004). Multicriteria optimization of a single-cell oil production. *European Journal of Operational Research*, 153 (2): 360–369.

Murén E, Ek B, & Rask L (2005). Processing of the 2S storage protein pronapin in Brassica napus and in transformed tobacco. *European Journal of Biochemistry* 227(1-2): 316–321.

Murén E, Ek B, Björk I, & Rask L (2004). Structural comparison of the precursor and the mature form of napin, the 2S storage protein in Brassica napus. *European Journal of Biochemistry* 242 (2): 214–219.

Myers RH, Montgomery DC, & Anderson-Cook CM (2009). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. John Wiley & Sons.

N

Naczk M, Amarowicz R, Sullivan A, & Shahidi F (1997). Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food chemistry* 62 (4): 489–502.

Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Adje EY, Traisnel J, Krier F, Mary P, Kouach M, Briand G, Guillochon D (2008). Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 29 (6), 969–977.

Nelson N (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* (153): 375–380.

Neumann GM, Condron R, Thomas I, & Polya GM (1996). Purification and sequencing of multiple forms of Brassica napus seed napin small chains that are calmodulin antagonists and substrates for plant calcium-dependent protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology* 1295 (1): 23–33.

Neumann GM, Condron R, & Polya GM (1996). Purification and sequencing of yellow mustard seed napin small and large chains that are phosphorylated by plant calcium-dependent protein kinase and are calmodulin antagonists. *Plant Science* 119 (1-2): 49–66.

NgaiPHK, &NgTB (2004). A napin-like polypeptide from dwarf Chinese white cabbage seeds with translation-inhibitory, trypsin-inhibitory, and antibacterial activities. *Peptides* 25 (2): 171–176.

Nielsen P, Petersen D, & Dambmann C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science* 66 (5): 642–646.

O

ONIOL. 2005. Conseil de direction du 16-11-2005.

P

Pace CN, Laurents DV, & Thomson JA (1990). pH dependence of the urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. *Biochemistry* 29 (10): 2564–2572.

Pande M, Kumari NKP, Dubey VK, Tripathi P, & Jagannadham MV (2009). Stability and unfolding studies on alkaline denatured state (Ip) of pepsin. *Process Biochemistry* 44 (8): 906–911.

Parker CA (1968). Photoluminescence of solutions: With applications to photochemistry and analytical chemistry. Elsevier Pub. Co.

Parmenter DL, Boothe JG, Rooijen GJH, Yeung EC, & Moloney MM (1995). Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Molecular Biology* 29 (6): 1167–1180.

- Pawlak Z (1998).** Rough set theory and its applications to data analysis. *Cybernetics and Systems* 29 (7): 661–688.
- Pedersen B. (1994).** Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technology* 48 (10): 96–76.
- Pedroche J, Yust MM, Lqari H, Girón-Calle J, Alaiz M, Vioque J, & Millán F (2004).** Brassica carinata protein isolates: chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis. *Food Chemistry* 88 (3): 337–346.
- Perea A, & Ugalde U (1996).** Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 18 (1): 29–34.
- Perrin E, Mandrille A, Oumoun M, Fonteix C, & Marc I (1997).** Optimisation globale par stratégie d'évolution. Technique utilisant la génétique des individus diploïdes. *RAIRO. Recherche opérationnelle* 31 (2): 161–201.
- Philips RD, & Beuchat LR (1981).** Enzyme modification of proteins. Ch 13. In protein functionality in Food J.P. Cherry (Ed): 275-298. ACS Symp. Ser 147. American Chemical Society. Washington, D.C.
- Pickardt C, Neidhart S, Griesbach C, Dube M, Knauf U, DKammerer DR, & Carle R (2009).** Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus L.*) meal. *Food hydrocolloids* 23 (7): 1966–1973.
- Plietz P, Damaschun G, Müller JJ, & Schwenke KD (1983).** The Structure of 11-S Globulins from Sunflower and Rape Seed. *European Journal of Biochemistry* 130 (2): 315–320.
- Powers JPS & Hancock REW (2003).** The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24 : 1681-1691.
- Privalov PL (1979).** Stability of proteins: small globular proteins. *Advances in Protein Chemistry* 33: 167-241
- Privalov PL (1985).** Energy characteristics of the structure of protein molecules. *Biofizika* 30 (4): 722–733.
- Proceedings of the 1st International Conference on Genetic Algorithms: 93-100*

R

- Rakow GI (2004).** 1 Species Origin and Economic Importance of Brassica. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 3–12.
- Randriamahatody Z, Sylla KSB, Nguyen HTM, Donnay-Moreno C, Razanamparany L, Bourgougnon N, & Bergé JP (2011).** Proteolysis of shrimp by-products (*Peaneus monodon*) from

Madagascar proteólisis de derivados de langostino (*Peaneus monodon*) de Madagascar. *CyTA - Journal of Food* 9 (3): 220–228.

Regente M, & de la Canal L (2001). Do sunflower 2S albumins play a role in resistance to fungi? *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (5): 407–413.

Rehman Z, & Shah WH (2005). Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry* 91 (2): 327–331.

Ribeiro SM, AlmeidaRG, Pereira CAA, Moreira JS, Pinto MFS, Oliveira AC, Vasconcelos IM, Oliveira JTA, Santos MO, & Dias Simoni C (2010). Identification of a *Passiflora alata* Curtis dimeric peptide showing identity with 2S albumins. *Peptides* 32 (5): 868-874.

Ribeiro SFF, Carvalho AO, Da Cunha M, Rodrigues R, Cruz LP, Melo VMM, Vasconcelos IM, Melo EJT, & Gomes VM (2007). Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 50 (5): 600–611.

Rico M, Bruix M, González C, Monsalve RI, & Rodríguez R (1996). 1H NMR Assignment and Global Fold of Napin BnIb, a Representative 2S Albumin Seed Protein. *Biochemistry* 35 (49): 15672–15682.

Rodrigues I, Coelho J, & Carvalho M (2011). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering* 109 (3): 337-346.

Rozañ P, Lamghari R, Linder M, Villaume C, Fanni J, Parmentier M, & Méjean L (1997). In Vivo and in Vitro Digestibility of Soybean, Lupine, and Rapeseed Meal Proteins after Various Technological Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (5): 1762–1769.

Rupley JA, Butler L, Gerring M, Hartdegen FJ, & Pecoraro R (1967). Studies on the enzymic activity of lysozyme, 3. The binding of saccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57 (4), 1088–1095.

S

SallehMRBM, Maruyama N, Adachi M, Hontani N, Saka S, Kato, N, Ohkawa Y, & Utsumi S (2002). Comparison of protein chemical and physicochemical properties of rapeseed cruciferin with those of soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (25): 7380–7385.

Salunke DK, Adsule RN, Chavan, JK, & Kadam SS (1992). World Oilseeds. Ed. Springer.

Sandiford CP, Tatham AS, Fido R, Welch JA, Jones MG, Tee RD, Shewry PR, Taylor AJN (1997). Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clinical & Experimental Allergy* 27 (10), 1120–1129.

- Sarkar D, & Modak JM (2004a).** Genetic algorithms with filters for optimal control problems in fed-batch bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26 (5): 295–306.
- Sarkar D, & Modak JM (2004b).** Optimization of fed-batch bioreactors using genetic algorithm: multiple control variables. *Computers & Chemical Engineering* 28(5) : 789–798.
- Sathe SK (2002).** Dry Bean Protein Functionality. *Critical Reviews in Biotechnology, Informa Healthcare*.22 (2): 175–223.
- Schaffer D (1985).** Multiple Objective Optimization with Vector Evaluated Genetic Algorithms.
- Schimmerling P, Sisson JC, & Zaïdi A (1998).** Pratique des plans d'expériences. Tec & Doc Lavoisier.
- Schmidt B, Loeschner K, Hadrup N, Mortensen A, Sloth JJ, Koch CB, & Larsen EH (2011).** Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83 (7): 2461–2468.
- Schweizer M. (2002).** Fractionnement et identification de petits peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines de colza. *Travaux de Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy*.
- Schwenke KD (1990).** Structural studies on native and chemically modified storage proteins from rapeseed (*Brassica napus L.*) and related plant proteins. *Die Nahrung* 34 (3): 225–240.
- Schwenke KD, Mothes R, Dudek S, & Görnitz E (2000).** Phosphorylation of the 12S globulin from rapeseed (*Brassica napus L.*) by phosphorous oxychloride: chemical and conformational aspects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (3): 708–715.
- Shahidi F (1990).** Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition, and processing technology. Ed. Springer.
- Shahidi F, & Naczk M. (1992).** An overview of the phenolics of canola and rapeseed: Chemical, sensory and nutritional significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69 (9): 917–924.
- Shen L, Wang X, Wang Z, Wu Y, & Chen J (2008).** Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry* 107(2): 929–938.
- Shewry PR, & Halford NG (2002).** Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53(370) 947–958.
- Silva CM, & Biscaia EC (2003).** Genetic algorithm development for multi-objective optimization of batch free-radical polymerization reactors. *Computers & Chemical Engineering* 27 (8): 1329–1344.
- Silvestre MPC (1996).** Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry* 60: 263–271.

Silvestre MPC, Hamon M, & Yvon M. (1994). Analysis of Protein Hydrolyzates. 1. Use of Poly (2-hydroxyethylaspartamide)-Silica Column in Size Exclusion Chromatography for the Fractionation of Casein Hydrolyzates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (12): 2778–2782.

Simard C, Dupont Y, & Boulet M (1977). Propriétés physicochimiques et composition en acides aminés de fractions de protéines de soja, de fève, de colza et de feuille de luzerne. *AGRICOLA, the online catalog of the National Agricultural Library* 10 (4): 326-330.

Smacchi E, & Gobetti M (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology* 17 (2): 129–141.

Spellman D, Mcevoy E, O’cuinn G, & Fitzgerald RJ (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal* 13 (6): 447–453.

Stapelfeldt H, Petersen PH, Kristiansen KR, Qvist KB, & Skibsted LH (1996). Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis of beta-lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. *The Journal of Dairy Research* 63 (1), 111–118.

Steinhardt H, & Beychok S (1964). Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules. Dans: *The Protein*. Ed. Academic Press, New York: Academic Press. Neurath H., 139-304.

T

Tan KC, Khor EF, Lee TH, & Yang YJ (2003). A Tabu-Based Exploratory Evolutionary Algorithm for Multiobjective Optimization. *Artificial Intelligence Review* 19 (3): 231–260.

Terras F, Schoofs H, Thevissen K, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammue B, & Broekaert W F (1993a). Synergistic Enhancement of the Antifungal Activity of Wheat and Barley Thionins by Radish and Oilseed Rape 2S Albumins and by Barley Trypsin Inhibitors. *Plant Physiology* 103 (4): 1311–1319.

Terras FR, Torrekens S, Van Leuven F, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammue BP, & Broekaert WF (1993b). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Letters* 316 (3): 233–240.

Tessier B, Harscoat-Schiavo C, & Marc I. (2006). Selective separation of peptides contained in a rapeseed (*Brassica campestris L.*) protein hydrolysate using UF/NF membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (10): 3578–3584.

Torp M, & Nirenberg HI (2004). *Fusarium langsthaie* sp. nov. on cereals in Europe. *International journal of Food Microbiology* 95 : 247-256.

Tossi A, Sandri L, & Giangaspero A (2000). Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science* 55 (1): 4–30.

Trelea IC, Titica M, & Corrieu G (2004). Dynamic optimisation of the aroma production in brewing fermentation. *Journal of Process Control* 14 (1): 1–16.

Turgeon SL, Gauthier SF, & Paquin P (1991). Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (4): 673–676.

Tzen JT, & Huang HA (1992). Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *The Journal of Cell Biology* 117 (2): 327–335.

Tzeng YM, Diosady LL & Rubin JL (1990). Production of Canola protein materials by alkaline extraction, precipitation, and membrane processing. *Journal of Food Science* 55 (4): 1147–1151.

U

Uruakpa FO & Arntfield SD (2005). Emulsifying characteristics of commercial canola protein–hydrocolloid systems. *Food research international* 38: 659–672.

V

Viennet R, Fonteix C, & Marc I (1996). New multicriteria optimization method based on the use of a diploid genetic algorithm: Example of an industrial problem. *Artificial Evolution* 1063: 120–127.

Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A, Pedroche J, & Millán F. (2000). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77 (4): 447–450.

Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A, Pedroche J, Bautista J, & Millán F (1999a). Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76 (7): 819–823.

Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A, Pedroche J, Bautista J, & Millán F (1999b). Purification and partial characterization of Chickpea 2S albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (4): 1405–1409.

W

Wanasundara U, Amarowicz R, & Shahidi F. (1994). Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (6): 1285–1290.

Wang CH, & Damodaran S (1991). Thermal gelation of globular proteins: influence of protein conformation on gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (3): 433–438.

Wang J, Wei Z, Li L, Bian K, & Zhao M (2009). Characteristics of enzymatic hydrolysis of thermal-treated wheat gluten. *Journal of Cereal Science* 50 (2): 205–209.

Wolpert DH, Macready WG (1997). No free lunch theorems for optimization. *Evolutionary Computation, IEEE Transaction* 1 (1): 67-82.

Wu J, & Muir AD (2008). Comparative structural, emulsifying, and biological properties of 2 major canola proteins, cruciferin and napin. *Journal of Food Science* 73 (3): C210–216.

Wu J, Aluko RE, & Muir AD (2008). Purification of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from the enzymatic hydrolysate of defatted canola meal. *Food Chemistry* 111(4): 942–950.

X

Xu L, & Diosady LL (1994a). Functional properties of Chinese rapeseed protein isolates. *Journal of Food Science* 59 (5): 1127–1130.

Xu L, & Diosady LL (1994b). The production of Chinese rapeseed protein isolates by membrane processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71 (9): 935–939.

Xu L, & Diosady LL (2000). Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media. *Food Research International* 33 (9): 725–731.

Xu L, & Diosady LL (2002). Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. *Food Research International* 35 (1): 23–30.

Xue Z, Yu W, Liu Z, Wu M, Kou X, & Wang J. (2009). Preparation and antioxidative properties of a rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate and three peptide fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (12): 5287–5293.

Y

Yamada Y, Iwasaki M, Usui H, Ohinata K, Marczak ED, Lipkowski AW, & Yoshikawa M (2010). Rapakinin, an anti-hypertensive peptide derived from rapeseed protein, dilates mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats via the prostaglandin IP receptor followed by CCK1 receptor. *Peptides* 31 (5): 909–914.

Yang ZH, Xiu JH, Zhu YM, & Shi XK (1988).Determination of glucosinolate in rapeseed meal by infrared spectrometry. *Analyst* 113 (2): 355–357.

Yoshie-Stark Y, Wada Y, Schott M, & Wäsche A (2006).Functional and bioactive properties of rapeseed protein concentrates and sensory analysis of food application with rapeseed protein concentrates.*LWT - Food Science and Technology* 39 (5): 503–512.

Yoshinori M, Li-ChanE, & Jiang B. (2010).Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals. Ed. John Wiley & Sons.

Yúfera E P, & Carrasco Dorrién JM (1987). Química agrícola: Alimentos. Alhambra.

Z

Zaroog MS, & Tayyab S (2012).Formation of molten globule-like state during acid denaturation of *Aspergillus niger* glucoamylase. *Process Biochemistry* 47 (5): 775–784.

Zhang B, Cui Y, Yin G, Li X, & Zhou X (2009). Alkaline extraction method of cottonseed protein isolate. *Modern Applied Science* 3 (3): 77.

Zhang J, Zhang H, Wang L, Guo X, Wang X, & Yao H (2009).Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. *European Food Research and Technology*, 229 (4): 709–719.

Zhang SB, Wang Z, & Xu SY (2008). Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85 (6): 521–527.

Zhang Y, & Cremer P (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10 (6): 658–663.

Extraction et protéolyse de napines de tourteau de colza : influence de l'état structural de la protéine sur la cinétique enzymatique, la composition et les fonctionnalités des hydrolysats.

Résumé. Ce travail se propose d'étudier le procédé de protéolyse enzymatique « contrôlé » par l'état structural initial du substrat en vue d'évaluer son influence sur la cinétique de protéolyse, ainsi que sur les propriétés physico-chimiques et les bioactivités associées des peptides libérés. Pour l'étude, nous avons utilisé un substrat modèle, une protéine connue pour ses propriétés antimicrobiennes, les napines. Cette catégorie de protéines est issue d'un co-produit de l'industrie oléifère faiblement valorisé : le tourteau de colza. Tout d'abord, un procédé d'extraction sélectif et de purification de napines a été mis en œuvre et optimisé à l'aide d'un plan d'expériences multicritère approprié. Le procédé d'extraction et de purification, réalisé initialement à l'échelle du laboratoire, a pu être extrapolé à plus grande échelle, en respectant une démarche d'éco-conception pour produire des napines en quantité suffisante pour la suite de l'étude. Ce travail a montré que les conditions opératoires du procédé retenu n'endommagent pas les structures secondaire et tertiaire de la protéine. Des activités antimicrobiennes des napines ainsi produites ont été validées sur différents micro-organismes pathogènes (*Bacillus coagulans* et *Fusarium langsethiae*). Dans un second temps, une étude concernant l'influence des paramètres pouvant avoir une action sur la structure de la protéine, a été réalisée. L'objectif a été de voir s'il était possible de placer la protéine dans des conditions de pH et de température permettant une déstructuration évolutive, en fonction du temps, et d'observer un éventuel impact sur la cinétique de la protéolyse des napines extraites et sur la nature des peptides libérés. Les résultats ont montré que pour un couple de pH/T donné, la « durée d'incubation » devient un facteur clé pour la dénaturation de napines. Ce dernier influence significativement la cinétique de la protéolyse, le mécanisme d'action de la protéase et, par conséquent, la composition des mélanges libérés. Par la suite, l'influence des hydrolysats sur la croissance de cellules animales productrices d'anticorps, cultivées en milieu sans sérum, et leurs capacités moussantes et émulsifiantes, ont été évaluées. Les résultats ont montré une influence majeure de l'état structural initial du substrat (via le degré d'hydrolyse atteignable pour chacune des conditions étudiées) sur les dites propriétés. Au final, ces études ont mis en avant non seulement le potentiel d'une valorisation accrue des napines de tourteau de colza mais aussi, et surtout, un paramètre déterminant sur le « contrôle » du procédé de protéolyse enzymatique pour la production dirigée de peptides.

Mots clés : napines, tourteau de colza, extraction, optimisation multicritère, dénaturation, état structural, procédé, protéolyse, protéase, cinétique, hydrolysat, peptides, bioactivités, propriétés fonctionnelles

Extraction and proteolysis of rapeseed meal napins: impact of the initial structural state of protein on the enzymatic kinetics, the composition and the peptide hydrolysates functionalities

Abstract. This work aims to study the process of enzymatic proteolysis “controlled” by the initial structural state of the substrate in order to assess its influence on the proteolysis kinetics as well as the physico-chemical properties and associated bioactivity of released peptides. For this study, rapeseed meal napins, known for its antimicrobial activity were used as a substrate. First, a selective extraction and purification process of napines were optimized by an appropriate experimental design. The extraction and purification process initially made at laboratory scale was easily scaled-up. We showed that the operating conditions of these processes would not damage the secondary and tertiary structure of the protein. Moreover, we confirmed an antimicrobial activity of the obtained napins on various microorganisms (*Bacillus coagulans* and *Fusarium langsethiae*). In a second step, the study on the influence of the parameters can have an effect on the structure of the protein was performed. The objectives were to see if it was possible to place the protein under conditions of pH and temperature for a progressive breakdown in function of time, and observe any impact on the kinetics of the proteolysis of napines extracted and the nature of the released peptides. The results showed that for a couple of pH / T given the "incubation duration" becomes a key factor for the denaturation of napines. This significantly influences the kinetics of proteolysis, the mechanism of action of the protease, and therefore, the composition of mixtures released. Subsequently, the influence of hydrolysates on the growth of antibody-producing animal cells grown in serum-free medium, and foaming and emulsifying capacity, were evaluated. The initial results showed a major influence of the structural state of the substrate (via the degree of hydrolysis achievable for each of the conditions studied) on such properties. Ultimately, these studies have highlighted not only the potential for increased value of napines rapeseed meal but also, and especially, a key parameter “to control” the process of enzymatic proteolysis for production directed peptides.

Keywords: rapeseed meal napins, extraction, multicriteria optimization, denaturation, structural state, process, proteolysis, protease, kinetic, hydrolysate, peptides, bioactivity, functional properties.