

Chapitre 2. Revue de littérature

2.1. Le lactosérum : production et défis liés à sa valorisation

Le lactosérum doux (pH 5,6) est le résultat de la coagulation du lait et la précipitation des caséines sous l'action de la présure lors de la production des fromages tel que le Cheddar [17] ; [18]; [19]. Généré pour la première fois il y a environ 5000 ans, le lactosérum a été directement destiné à la consommation humaine mais aussi valorisé comme ingrédient médicinal entre le 17^{ème} siècle et les débuts du 19^{ème} siècle. Au 20^{ème} siècle, les produits de l'industrie laitière, dont la production est directement liée à celle du lactosérum, ont pris une large place sur le marché alimentaire au détriment de ce dernier ce qui a changé sa position sur le marché de fluide laitier « noble » à coproduit non désirable [18]. En effet, ce coproduit de l'industrie laitière est généré en quantités importantes : environ 2 100 000 tonnes de lactosérum sont produites au Canada dont 1 200 000 pour le Québec, selon le site du Conseil des industriels laitiers du Québec (2017). Jusqu'à la fin des années 80, le lactosérum de fromagerie était fréquemment utilisé dans la fertilisation du sol et l'alimentation animale. Il était aussi courant de simplement déverser le lactosérum dans les rivières, les lacs et les océans sans traitement préalable. Ces habitudes engendraient ainsi une pollution importante des écosystèmes [17]; [20] dû à sa forte teneur en lactose (46-52 g/L) qui est, principalement, à l'origine de la demande biochimique en oxygène (DBO₅ : Demande Biochimique en Oxygène après 5 jours) élevée du lactosérum, allant de 35 à 45 kg/L [20].

Afin de mettre en place une politique de gestion de cet effluent, une norme sur les effluents des traitements agroalimentaires a été établie au Québec en décembre 2011, réglementant la DBO à une valeur moyenne de 10 mg/L. De ce fait, grâce à l'implantation d'une réglementation stricte quant aux rejets non traités de lactosérum, la valorisation du lactosérum s'est démocratisée parallèlement aux récents progrès scientifiques et technologiques qui ont démontré sa richesse en composés nutritionnels et fonctionnels d'intérêt, particulièrement en protéines [17] ; [20]. Par conséquent, ce coproduit longtemps considéré comme non efficacement valorisable, est devenu un sujet de recherche international quant aux propriétés fonctionnelles de ces constituants [17]. En effet, actuellement, les constituants du lactosérum sont utilisés principalement pour leurs propriétés nutritionnelles (protéines et peptides bioactifs) et fonctionnelles (gélification, liaison de l'eau, pouvoir moussant). Plus spécifiquement, et parmi l'ensemble des constituants protéiques du lactosérum, la β -LG a sans doute été la plus étudiée tant pour ses propriétés fonctionnelles que pour les effets bioactifs des peptides générées suite à son hydrolyse enzymatique.

2.2. La β -lactoglobuline

2.2.1. Structure et propriétés physico-chimiques

Appartenant à la famille des lipocalines, la β -LG (**Figures 1a et b**), protéine majoritaire du lactosérum (représente environ 55% de l'ensemble des protéines), présente une structure globulaire [12]; [21]. Il existe 11 variants génétiques, cependant, les variants A et B, qui diffèrent par la substitution de deux acides aminés Ala₆₄-Gly₆₄ et Val₁₁₈-Ala₁₁₈, sont les plus répandus [22]. Chaque monomère de β -LG est composé de 162 acides aminés formant une chaîne polypeptidique ayant une masse moléculaire de 18,4 kDa (Figure 1) [1]. Le point isoélectrique de la β -LG est de 5,2.

La β -lg est composée de 10% d'hélices α , et de 50% de feuillets β responsables de la formation d'une cavité hydrophobe au cœur de la protéine caractéristique de l'ensemble des protéines de la famille des lipocalines [5]; [19]; [11]. De nature hydrophobe, la cavité donne la capacité à la β -LG de lier plusieurs espèces hydrophobes (vitamines lipophiles, rétinol, acides gras, etc.) [11]; [22], [24]; [23]. Cette cavité, caractéristique de la structure tertiaire d'un monomère de β -LG, repose sur le repliement des chaînes protéiques de la structure secondaire, composées principalement de 8 brins antiparallèles β (A-H : **Figure 1a**) liés par des liaisons hydrogènes et bordés par une hélice α constituée par l'arrangement de plusieurs acides aminés. Le 9^{ème} brin β est directement impliqué dans la configuration dimérique de la protéine suite à des liaisons intermoléculaires avec le même brin d'un autre monomère, moyennant des interactions électrostatiques (**Figure 2-b**). Cette structure dimérique est aussi maintenue par des liaisons hydrogènes situées de part et d'autre des deux monomères et mettant en jeu leurs courbures β (AB) ou « AB loops » (**Figure 2-a**) [23].

La β -LG possède 5 résidus cystéines (Cys), Cys₁₆₀, Cys₁₂₁, Cys₁₁₉, Cys₁₀₆, Cys₆₆, formant deux ponts disulfures (S-S) (**Figure 1b**) qui assurent la stabilité de la protéine, et un groupement thiol libre au résidu Cys₁₂₁. La présence de ce groupement libre est largement responsable des modifications structurales de la β -LG sous différentes conditions de pH, de température et de pression [25]. En effet, l'application de ces diverses conditions physico-chimiques à une solution de β -LG permet essentiellement de dévoiler la fonction thiol libre initialement non disponible au sein de la cavité hydrophobe et qui va ainsi pouvoir réagir pour générer des réactions d'échange SH/S-S en fonction de l'intensité des paramètres appliqués [26]; [27]; [28]. Ces réactions d'échange SH/S-S vont engendrer la polymérisation ou la gélification de la protéine dont le degré d'intensité est directement liée aux paramètres physico-chimiques appliqués.

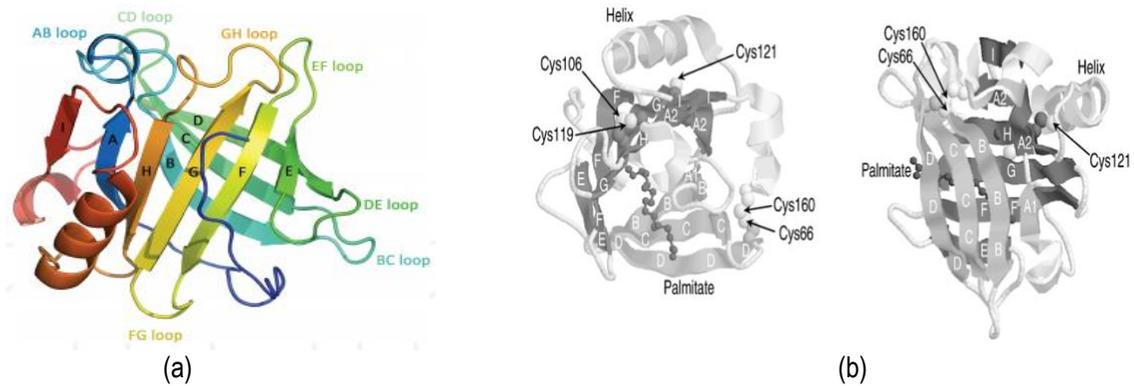


Figure 1. Structure tertiaire du monomère de la β -LG montrant : les 8 brins antiparallèles β (A-H) liés par des liaisons hydrogène formant des courbures β « loops » (a) et les positions relatives des cinq résidus cystéines formant deux ponts disulfures (b) [27]; [23]

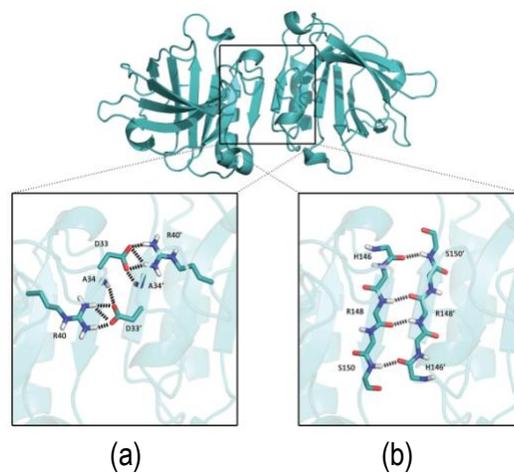


Figure 2. Structure dimérique de la β -LG formée par l'interaction électrostatique entre les résidus Asp₃₃ et l'Arg₄₀ des courbures AB et l'association antiparallèle des brins β (I) de chaque monomère [23]

Bien qu'étudiée principalement pour ses propriétés fonctionnelles et nutritionnelles [29]; [5]; [9], de nombreux travaux se sont également intéressés à l'hydrolyse enzymatique de la β -LG afin de générer des hydrolysats riches en peptides bioactifs [12]; [5]; [30].

2.2.2. L'hydrolyse enzymatique de la β -LG et la production de peptides bioactifs

2.2.2.1. Généralités sur l'hydrolyse enzymatique de la β -LG

Les peptides dérivés des protéines du lait ont été considérablement étudiés par leurs activités biologiques bénéfiques pour l'organisme [31]; [32]; [33]. Les peptides bioactifs sont des molécules de faible poids moléculaires, composé généralement de 2 à 20 acides aminés. Ces fragments peptidiques sont naturellement inactifs au sein de la chaîne protéique, cependant, une fois libérés par hydrolyse chimique ou enzymatique ou encore par fermentation microbiologique, ces peptides ont le pouvoir d'exercer différentes activités biologiques bénéfiques pour l'organisme. Leurs effets bioactifs sont inhérents aux acides aminés qui les composent [34]; [32] et peuvent être de nature antihypertensive [32], antidiabétique[33], antioxydante [35] et hypocholestérolémique [5].

La production de tels dérivés peptidiques a majoritairement été réalisée par hydrolyse enzymatique de la protéine cible. Ces enzymes jouent le rôle de catalyseurs biologiques qui accélèrent la réaction de dégradation protéique et dont l'efficacité dépend du ratio enzyme : substrat (E:S) utilisé et d'autres conditions telles que : le pH, la température et la pression [11]. Parmi l'ensemble des protéines utilisées comme modèles protéiques afin d'évaluer l'impact du processus d'hydrolyse sur les modifications structurales et la production de biopeptides, la β -LG est sans aucun doute la protéine laitière la plus étudiée [5]. Plus spécifiquement, l'hydrolyse de la β -LG par la chymotrypsine [26], la thermolysine [36] ou la pepsine [6] ont permis de générer des peptides bioactifs. L'hydrolyse trypsique de la β -LG [1]; [30]; [7]; [5] reste néanmoins la plus documentée.

2.2.2.2. L'hydrolyse trypsique de la β -LG

La trypsine est une endoprotéase synthétisée par les cellules du pancréas, et qui, en présence d'une chaîne protéique d'acides aminés, agit en coupant spécifiquement du côté C-terminal des acides aminés : Arginine (Arg/R) et Lysine (Lys/K) [28]; [37]; [38]. Plusieurs études ont porté sur la caractérisation des hydrolysats trypsiques de la β -LG en vue d'identifier les peptides générés. Les **Figures 3 et 4** présentent respectivement un chromatogramme conventionnel d'un hydrolysats trypsique de β -LG (solution de β -LG à 10% (w/v) a été hydrolysée par la trypsine avec un ratio E:S de 1:1200, à 40°C et à pH 8) et l'ensemble des caractéristiques des espèces peptidiques générées [39].

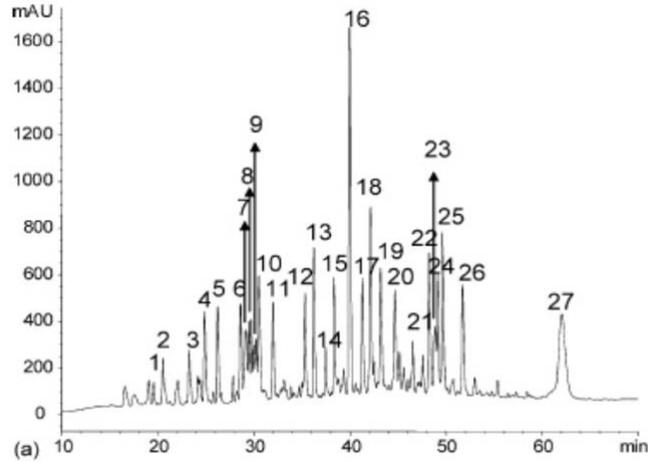


Figure 3. Profil peptidique conventionnel d'un hydrolysate trypsinique de β -LG [39]

Peak number	Peptidic sequence	Amino acid sequence	Exp. mass (g mol ⁻¹)	Physico-chemical characteristics			
				pI ^a	Net charge ^b		Group ^c
					pH 5	pH 9	
1	146-148	(M)HIR ^d	424.3	9.76	1.91	0.60	B
2	136-138	(K)FDK	408.3	5.84	0.07	-0.39	N
3	41-42	(R)VY	280.2	5.49	0.00	-0.27	N
4	71-75	(K)IIAEK	572.4	6.00	0.15	-0.20	N
5	33-40	(L)DAQSAPLR	856.5	5.84	0.07	-0.13	N
6	84-91	(K)IDALNENK	915.5	4.37	-0.78	-1.20	A
7	83-91	(F)KIDALNENK	1043.7	6.07	0.22	-0.59	N
8	61(69,70) _{A,B} + 61-69 _{A,B}	(K)WEN(D _A ,G _B)ECAQ(K,K) + (R)WEN(D _A ,G _B)ECAQK ^e					
9	33-39	(L)DAQSAPL	700.3	3.8	-0.93	-1.13	A
10	9-14	(K)GLDIK	672.4	5.84	0.07	-0.17	N
11	125-135	(R)TPEVDDEALEK	1244.8	3.83	-3.41	-4.22	A
12	1-8	LIVTQTMK	932.7	8.75	1.00	0.78	B
13	142-148	(K)ALPMHIR	836.5	9.8	1.91	0.83	B
14	92-101	(K)VLVLDTDYKK	1192.8	5.93	0.14	-0.33	N
15	125-138	(R)TPEVDDEALEKFDK	1635.5	4.02	-3.34	-4.25	A
16	15-20	(K)VAGTWY	695.4	5.49	0.00	-0.27	N
17	61-70 _{A,B} + 149-162	(K)WEN(D _A ,G _B)ECAQKK + (R)LSFNPTQLEEQCHI	2906.7 _A 2848.8 _B	4.574.91	-0.48 -0.48	-2.35 -2.35	A A
18	61-69 _{A,B} + 149-162	(K)WEN(D _A ,G _B)ECAQK + (R)LSFNPTQLEEQCHI	2778.5 _A 2720.5 _B	4.254.48	-2.42 -1.48	-4.32, -3.32	A A
19	76-82	(K)TKIPAVF	774.4	8.41	1.00	0.78	B
20	78-82	(K)IPAVF	545.3	5.52	0.00	-0.17	N
21	43-57	(Y)VEELKPTPEGDLEILL	1681.0	3.91	-3.33	-4.22	A
22	43-60	(Y)VEELKPTPEGDLEILLQK	2050.9	4.25	-2.33	-3.25	A
23	41-5721-40	(R)VYVEELKPTPEGDLEIL (Y)SLAMAASDISILLDAQSAPLR	1943.82029.7	3.914.21	-3.33 -0.86	-4.30, -1.41	A A
24	149-162 + 149-162	(R)LSFNPTQLEEQCHI + (R)LSFNPTQLEEQCHI	3315.0	4.47	-1.58	-4.18	A
25	41-60	(R)VYVEELKPTPEGDLEILLQK	2313.2	4.25	-1.48	-2.33	A
26	21-32	(Y)SLAMAASDISLL	1190.7	3.8	-0.93	-1.41	A
27	α -LA		14176.2				

Figure 4. Identification par LC-MS des séquences peptidiques détectées dans le profil chromatographique de l'hydrolysate trypsinique de β -LG [39]

Parmi l'ensemble des espèces peptidiques listées à la **Figure 4**, plusieurs ont été largement étudiées pour leurs propriétés bioactives tel que présenté dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Liste des différentes séquences peptidiques bioactives générées par hydrolyse trypsique de la β -LG

Séquence en acides aminées	Fragment peptidique	Bioactivités	Références
IDALNENK	f(84-91)	Antihypertensive	[40]
GLDIQK	f(9-14)	Hypocholestérolémique	[41]
LDAQSAPLR	f(32-40)	Antihypertensive	[31]
IIAEK	f(71-75)	Antihypertensive Hypocholestérolémique	[5] [38]
TPEVDDEALEK	f(125-135)	Antidiabétique	[7]
ALPMHIR	f(142-148)	Antihypertensive	[42]
VAGTWY	f(15-20)	Antidiabétique Antioxydante	[7] [5]
IPAVF	f(78-82)	Antihypertensive Antidiabétique	[6] [7]
IPAVFK	f(78-83)	Antihypertensive Antibactérienne	[5] [38]
IIVTQTMK	f(1-8)	Antihypertensive	[40]
IIAEKTK	f(71-77)	Antihypertensive	[40]
VLVLDTDYK	f(92-100)	Antihypertensive Antibactérienne	[40] [38]
VFK	f(81-83)	Antihypertensive	[31]

2.2.3. Limites de l'hydrolyse enzymatique de la β -LG

Le contrôle des paramètres d'hydrolyse (choix de l'enzyme, ration E/S, pH, température, durée du processus) est crucial dans le processus de production de peptides bioactifs et la standardisation des hydrolysats générés. Cependant, réalisé sous pression atmosphérique, cette étape de digestion peut s'avérer potentiellement lente voire très peu efficace tel que démontré lors de l'hydrolyse pepsique de la β -LG native [36]; [1]. L'action de la chymotrypsine a également été étudiée sous les mêmes conditions et une résistance de la protéine native à l'hydrolyse chymotrypsique a fortement limitée l'efficacité de la digestion enzymatique [26]. Une optimisation de l'hydrolyse de la β -LG nécessite ainsi l'utilisation de concentrations élevées d'enzymes dont l'action catalytique reste minime [43] et dont les coûts d'achat peuvent s'avérer importants [9], ce qui vient limiter davantage l'utilité de ce processus. Afin de répondre à ces problématiques, plusieurs études ont présenté des stratégies visant à améliorer considérablement le

processus d'hydrolyse protéique par une dénaturation préalable de la β -LG. Reddy et al. (1988) ont découvert qu'un préchauffage de la β -LG à 80°C et à 90°C a considérablement augmenté l'action protéolytique de enzymes utilisées [26]. Cependant, selon Leeb et al. (2015), le traitement à la chaleur de la β -LG est à l'origine du phénomène d'agrégation protéique et donc d'une diminution du degré d'hydrolyse et de la production de peptides bioactifs [38]. D'autres travaux de recherche ont porté sur l'utilisation des HPH en remplacement de l'application de températures élevées afin d'optimiser davantage la génération d'espèces peptidiques et les rendements d'hydrolyse enzymatique de la β -LG [36]; [1]; [11]; [4]; [25]; [27]; [44]; [9].

2.3. Les hautes pressions hydrostatiques

2.3.1. Principe des HPH et description du système de pressurisation

Le procédé utilisant les HPH (**Figure 4a**) repose sur l'application d'une pression de type « isostatique », c'est-à-dire appliquée de façon instantanée et uniforme sur l'ensemble de la surface du produit traité. Le liquide de pressurisation utilisé pour la transmission de cette pression est généralement l'eau [45]. Lors d'un traitement sous HPH, les pressions appliquées sont comprises entre 0,1 et 1000 MPa [46]; [47]. Suite à la pressurisation, la décompression est le plus souvent instantanée. Plusieurs types de compressions peuvent être appliquées mais celle prédominante dans les procédés alimentaires est la compression indirecte (**Figure 5b**) durant laquelle une pompe à hautes pressions transfère le fluide de pressurisation (eau) dans une enceinte close elle-même saturée en eau (**Figure 4b**). L'aliment, à l'intérieur du système, subit alors une déformation mineure, de façon indirecte, jusqu'à atteinte de la pression désirée [1]; [10].

Contrairement aux traitements chimiques d'aseptisation, la pressurisation appliquée n'agit pas uniquement en surface mais au sein de la matrice alimentaire [48]. D'autre part, et globalement, les HPH se distinguent des traitements thermiques par la conservation des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments traités tout en assurant l'inhibition des microorganismes d'altération et des pathogènes [10]; [45].

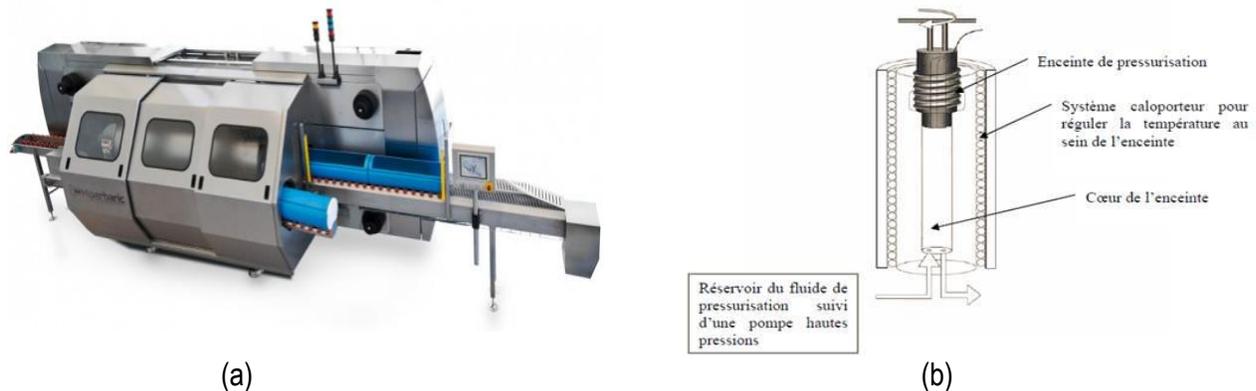


Figure 5. Système industriel des HPH (a) et principe de la compression indirecte (b) (Hiperbaric) [49]

2.3.2. Utilisations des HPH en industries alimentaires

La première utilisation des HPH a été documentée dès 1895 lorsque Royer a démontré les caractéristiques d'inhibition d'une pressurisation isostatique sur diverses bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. En 1899, Hite a montré que l'application d'un traitement de 600 MPa pendant 1 heure permettait d'inhiber les microorganismes pathogènes et d'augmenter la durée de conservation du lait cru jusqu'à 4 jours. Et 1914, le même auteur a utilisé le pouvoir bactéricide des HPH afin d'améliorer la conservation des fruits et légumes [45] ; [10]. En termes de modes d'actions sur les microorganismes, les HPH engendrent, tout dépendamment du niveau de pressurisation et de la durée du traitement, une déstabilisation de la bicouche phospholipidique et une dénaturation des protéines membranaires engendrant la formation de pores membranaires et le relargage du contenu cellulaire vers le milieu extérieur. Une dénaturation du matériel génétique (ADN, ARN) a également été documentée. En lien avec ces propriétés inhibitrices, la technologie utilisant les HPH a été particulièrement développée au Japon par la mise en place d'un système industriel de conservation des aliments par HPH en 1993 [50] ; [45]. Cette utilisation du procédé s'est par la suite démocratisée en Europe et dans le reste du Monde. En parallèle, de nouvelles applications ont été étudiées, dans le domaine alimentaire.

Ainsi, plusieurs travaux ont porté sur l'application des HPH pour le traitement de diverses matrices alimentaires afin de diminuer leur allergénicité [12]. En effet, les HPH ayant un impact sur la structure des protéines, diverses études ont visé l'étude de l'inhibition de l'allergénicité des protéines alimentaires suivant des traitements de pressurisation. Un traitement d'hydrolyse protéolytique par la Flavourzyme® sous HPH (400 à 500 MPa, 15min), s'est avérée efficace pour diminuer de 99,5% le pouvoir allergénique d'un isolat de protéines de soja [51]. Récemment, Zhang et al. (2017) ont démontré qu'un traitement à 600 MPa

pendant 20 min a permis de diminuer drastiquement l'allergénicité de l'hémocyanine provenant du calamar [52]. Une baisse de la production d'IgE a également été observée chez les souris suite à une combinaison de la pressurisation (650 MPa) et de la chaleur (100°C, 15 min) sur une matrice de noix [53]. Le pouvoir anti-allergénique des HPH a également été étudié sur les protéines du lactosérum. Peñas et al. (2006) ont ainsi prouvé qu'un traitement à 200 ou 300 MPa pendant 15 min d'un mélange de lactosérum et de trypsine ou de pepsine, résulte en une diminution considérable de l'immunoréactivité des hydrolysats obtenus [12]. Plus spécifiquement, parmi ces protéines sériques, la β -LG, de par son rôle important dans l'allergénicité du lait et des produits laitiers, a été particulièrement ciblée [9]. Son pouvoir allergène est due à la rigidité de la structure tertiaire de la β -LG et de sa stabilité face à l'hydrolyse gastrique [54]. Cependant, le pouvoir allergène de la β -LG peut être diminué suite à la dénaturation de la protéine native par HPH engendrant des modifications de la structure tertiaire et une exposition des zones hydrophobes de la protéine [54]. La combinaison de l'hydrolyse enzymatique et des HPH s'est avérée également plus efficace quant à l'atténuation de l'effet allergénique de la β -LG par dénaturation complète de la protéine à 400 MPa pendant 5 min [55].

Une autre application des HPH dans le domaine alimentaire vise l'amélioration des propriétés fonctionnelles de diverses matrices protéiques alimentaires. En effet, la dénaturation protéique lors du traitement de pressurisation résulte en une augmentation de l'exposition des parties hydrophobes de la molécule traitée. Ainsi, les propriétés amphiphiliques induites permettent par exemple d'améliorer les propriétés moussantes [29] des solutions protéiques pressurisées. De plus, et suite aux traitements par HPH, les phénomènes d'agrégation engendrés par la formation de liaisons intermoléculaires par des ponts disulfures [56] favorisent généralement la formation d'un film viscoélastique aux interfaces huile/eau et air/eau, améliorant ainsi les propriétés émulsifiantes et moussantes des protéines.

Dans le cas de la β -LG, l'effet des HPH sur ses propriétés fonctionnelles dépend largement des paramètres de pressurisation et des propriétés recherchées (gélification, propriétés texturantes, etc.) du produit fini. En effet, la modification de la structure native de la β -LG, impliquant l'augmentation de son hydrophobicité ainsi que son agrégation, peut impacter positivement ses propriétés émulsifiante et moussante [22]. Cependant, Aouzelleg (2014) a montré que les propriétés émulsifiantes de la β -LG n'étaient pas améliorées suite à une étape de traitement sous HPH [29]. Ces observations concordent avec celles de Dumay et al. (1994) qui ont stipulé qu'un traitement de 300 à 900 MPa diminuait drastiquement les propriétés émulsifiantes et moussantes de la β -LG suite à la formation d'agrégats protéiques à faible mobilité ce qui limite leur sensibilité à l'action des surfactants [57]. Ces différents exemples montrent que les applications des HPH dans le domaine alimentaire sont globalement en lien avec le type et la

concentration protéique des différentes matrices traitées. Ainsi, la prochaine section présente en détail l'effet des HPH sur les protéines et les mécanismes d'action du traitement de pressurisation sur les structures protéiques.

2.3.3. Effets des HPH sur les protéines alimentaires

Avant d'étudier les effets des HPH sur les systèmes protéiques, il est nécessaire de comprendre la nature des effets liés à la pression et leur impact sur l'équilibre physico-chimique des systèmes pressurisés.

2.3.3.1. Facteurs physiques et thermodynamiques : Principe de Le Chatelier

L'effet des HPH sur les systèmes biologiques est régi par le principe de Le Chatelier qui implique que chaque pression appliquée à un biosystème, initialement en équilibre, engendre une réaction de ce dernier pour retrouver un nouvel état d'équilibre ; une réaction qui se traduit par une diminution du volume d'eau initial due au réarrangement des molécules à l'intérieur de la matrice alimentaire [50] ; [45] ; [48]. Cet effet de compression volumique est appelé aussi, selon Rivalain et al. (2010), effet de densification, qui implique une différence de volume (ΔV) négative [45], avec :

$$\Delta V = V_f - V_i \quad \text{Équation 1}$$

où ΔV (cm^3) est la différence de volume (V) entre V_f : le volume final et V_i : volume initial [50].

2.3.3.2. Facteur énergétique et interactions chimiques :

Lors d'un processus réactionnel, et lorsqu'un système n'est plus en équilibre, il évolue spontanément pour rejoindre un état thermodynamique plus stable. Dans ce cas, son enthalpie libre ou l'énergie libre de Gibbs (ΔG) va évoluer dépendamment de la pression appliquée au système en question, selon l'équation suivante :

$$\left(\frac{\partial(\Delta G)}{\partial P}\right)_T = -\Delta V/RT \quad \text{Équation 2}$$

où δ est le symbole de la fonction dérivée, ΔG : différence entre deux énergies libres de Gibbs (G) (kJ/mol), P : Pression du système (Pa), T : Température (constante) du système ($^\circ\text{C}$), ΔV : différence de volume du système en cm^3/mol , R : constante des gaz parfait (sans unité).

Ceci impacte directement l'énergie cinétique de la réaction [58] ; [45]. En effet, la cinétique réactionnelle va diminuer ou augmenter selon le signe de la ΔV qui est défini par la nature des liaisons mises en jeu et l'intensité de la pression appliquée [59]. Ainsi, et contrairement aux procédés thermiques, l'énergie transmise par un traitement de pressurisation est largement inférieure à celle des liaisons chimiques d'une molécule ce qui limite l'effet de la pressurisation aux faibles liaisons seulement [45]. En effet, le phénomène de compression volumique expliquée précédemment par le principe de Le Chatelier (section 2.3.1.1.) résulte en une $\Delta V_{\text{dissociation}}$ négative, caractéristique des liaisons faibles. En se basant sur le **Tableau 2**, il est possible de constater que les liaisons hydrophobes, responsables de la stabilité de la structure tertiaire des protéines, se distinguent par une ΔV fortement négative ce qui implique une sensibilité accrue de ce type de liaisons à l'effet de la pression [45]. De surcroît, selon Tomasula et al. (2014), les liaisons hydrophobes et ioniques sont rompues à partir d'une pression de 200 MPa, contrairement aux liaisons covalentes, responsables de la structure primaire des protéines, qui restent intactes après un traitement de pressurisation [48].

Tableau 2. Les effets des HPH sur les différentes interactions chimiques (adapté de [45])

TYPE D'INTERACTION	$\Delta V_{\text{DISSOCIATION}} \text{ (ML. MOL}^{-1}\text{)}$	EFFET DE LA PRESSION
Covalente	+10	Stabilisation
Ionique	-10	Déstabilisation
Hydrogène	+3 à -1	Stabilisation ou faible déstabilisation
Hydrophobe	< 0 (de -10 à -20)	Déstabilisation

2.3.3.3. Mécanisme de la dénaturation des protéines par les HPH

Les protéines sont des macromolécules sous forme de chaînes polypeptidiques composées d'une succession d'acides aminés dont les liaisons sont covalentes, ce qui correspond à la structure primaire des protéines. Ces chaînes polypeptidiques se lient entre elles par des liaisons hydrogènes intra- ou intermoléculaires pour former la structure secondaire des protéines, qui, se plie et s'enroule en formant des liaisons non-covalentes incluant : les liaisons hydrogènes, ioniques, hydrophobes et les forces de Van der Waals, pour former une structure tertiaire sous forme de monomère. Finalement, ces structures tertiaires s'arrangent sous formes de dimères ou de polymères pour former des structures quaternaires [60]. Selon les données du **Tableau 2**, les HPH ont très peu, voire aucun impact sur la structure primaire des protéines puisque la pressurisation ne permet pas d'engendrer un bris des liaisons covalentes. Cependant, les

structures protéiques tertiaire et quaternaire, stabilisées par des liaisons faibles, sont davantage réactives à l'action de la pression puisque l'énergie générée par la pressurisation est suffisante pour déstabiliser ce type de liaisons. Le bris des liaisons faibles par les HPH est à l'origine de la dénaturation totale ou partielle de la structure native des protéines. Hormis le fait qu'un dépliement de la structure protéique s'établit sous pression, la dénaturation permet également de dévoiler certaines fonctions, dont les fonctions thiols libres qui pourront réagir entre elles et créer des ponts disulfures intra- ou intermoléculaires. Ces ponts disulfures, jouant initialement un rôle de compaction et de stabilisation des structures protéiques, sont, dans ce cas, davantage à l'origine du phénomène d'agrégation protéique [60].

La solvation des protéines joue également un rôle majeur dans leur dénaturation lors d'un traitement de pressurisation. Ce principe s'explique par le diagramme de dénaturation protéique sous pression présenté à la **Figure 6**. L'aspect elliptique de la dénaturation protéique met l'accent sur le rôle de l'eau dans le phénomène de dénaturation protéique. En effet, la pénétration de l'eau dans la protéine est facilitée sous l'action de la pression suite au dépliement de la protéine et d'une perte de la structure tertiaire et secondaire par déstabilisation des liaisons hydrophobes [58]. Ceci correspond à la première étape du phénomène de dénaturation, présentée par l'équation chimique suivante [61] :



Durant cette étape, l'interaction des composants non-polaires avec l'eau augmente suite au passage de ces composés hydrophobes dans le solvant. Par conséquent, une diminution du volume de la protéine accompagne cette étape, ce qui se traduit par une ΔV négative. En effet, le volume partiel des protéines dans l'eau (V_i) est la somme des volumes intrinsèques : Volumes de Van der Waals des constituants protéiques et le volume des cavités présentent naturellement dans la conformation de la protéine ; ainsi que le volume d'hydratation qui résulte de l'interaction protéine-solvant. Comme les volumes de Van der Waals restent inchangés lors de la dénaturation protéique, seuls les autres volumes vont pouvoir changer par réhydratation des composés hydrophobes ce qui contribue à la diminution, voire la disparition quasi-complète, des cavités hydrophobes. Ce phénomène est à l'origine d'une importante perte volumique [58]. Cet aspect s'explique à la fois par le principe de Le Chatelier, détaillé précédemment, ainsi qu'un second principe d'ordre microscopique et qui implique que l'application d'une pression croissante à un système biologique, à température constante, est à l'origine d'un réarrangement moléculaire ou encore une diminution de son entropie [60].

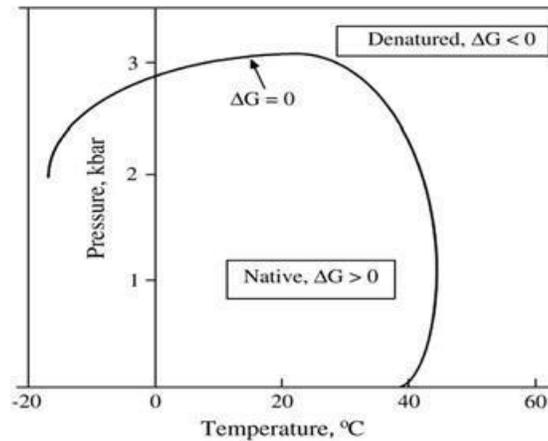


Figure 6. Diagramme de dénaturation protéique sous pression [45]

2.3.4. Effets des HPH sur la β -LG

Plusieurs études ont spécifiquement porté sur le traitement de la β -LG à des HPH variant de 100 à 900 MPa [57]. La pressurisation de cette protéine sérique engendre des modifications structurales pouvant être intramoléculaires ou intermoléculaires, tout dépendamment de l'intensité de la pression appliquée [27]. Ainsi, la sensibilité de la β -LG aux HPH est graduelle, et résulte en une dénaturation, réversible ou irréversible, de la structure tertiaire de la protéine suite au réarrangement des groupements thiols et l'exposition en surface des groupements hydrophobes, présents naturellement au cœur de la molécule [57]; [56]. En effet, comme expliqué schématiquement à la **Figure 7**, les HPH sont capables de déstabiliser la cavité protéique hydrophobe suite à son ouverture et sa fonte ou encore son déploiement par réhydratation des composés hydrophobes [27]; ce phénomène implique une perte volumique qui résulte en une ΔV négative, ou encore un effet de densification, une caractéristique du principe de Le Chatelier présenté précédemment (2.3.3.1.1).

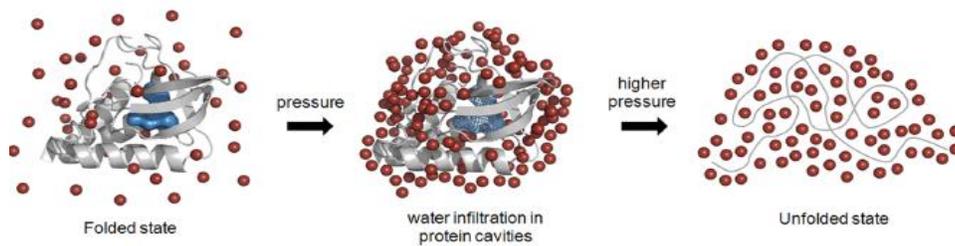


Figure 7. Représentation schématique de la dénaturation de la structure protéique par réhydratation de la cavité hydrophobe [62]

Selon Dumay et al. (1994), la réversibilité de la dénaturation de la β -LG sous HPH est observée jusqu'à 175 MPa et à pH neutre. Une augmentation de pression de 500 à 700 MPa assure une dénaturation complète et irréversible de la protéine. À 300 MPa, la dénaturation de la β -LG peut être confirmée par l'étude du comportement de la protéine en solution ou encore dynamique protéique aussi bien qu'en étudiant sa structure moléculaire [57]. Russo et al. (2013) ont indiqué qu'à partir d'un traitement de la β -LG à 300 MPa, un ralentissement de la dynamique de la protéine est observé, ce qui marque le début de la phase du dépliement protéique et la pénétration de l'eau dans la cavité hydrophobe [63]. En effet, la dénaturation de la β -LG sous HPH est marqué par 3 étapes distinctes présentées à la **Figure 8** : (1) un dépliement partiel de la protéine à environ 50 MPa et une augmentation de l'hydrophobicité de surface, (2) une perte réversible de la structure globulaire et une dissociation du dimère en monomères avec l'exposition et l'hydratation des groupements hydrophobes à des pressions de l'ordre de 100 à 200 MPa et finalement (3) une dénaturation irréversible des composés monomériques de la β -LG au-delà de 300 MPa et la formation de ponts disulfures entre les différentes parties protéiques exposées en surface, engendrant la formation d'oligomères [1]; [11]; [4]; [27]; [44].

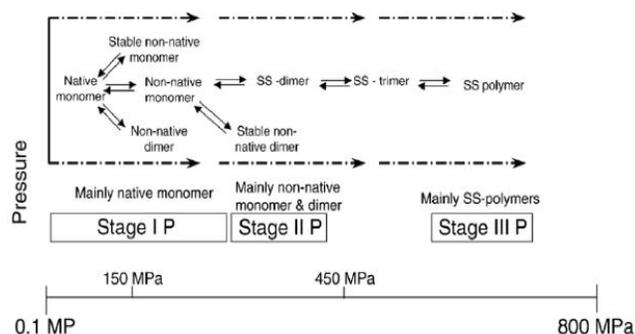


Figure 8. Stades de dénaturation de la β -LG en fonction des niveaux de pressions hydrostatiques appliqués [27]

Par conséquent, l'effet dénaturant des HPH est majoritairement dépendant de l'intensité de la pression appliquée, la durée jouant également un rôle mais de moindre importance. Néanmoins, d'autres paramètres physico-chimiques combinés à la pressurisation, tels que le pH, permettent d'atténuer ou d'accentuer l'effet dénaturant des HPH. Ainsi, à pH acide et dans une solution de faible force ionique, un dépliement de la β -LG à 350 MPa peut être réversible, cependant, à pH neutre, ce dépliement n'est que partiellement réversible suite à la formation de ponts disulfures intermoléculaires [63].

2.3.5. Utilisation des HPH pour améliorer l'hydrolyse enzymatique de la β -LG

Comme mentionné précédemment, les protéines, tout dépendamment de leur structure et des paramètres de pressurisation appliqués, subissent une dénaturation suite à une rupture des liaisons faibles (hydrogènes, électrostatiques, hydrophobes) et tendent à s'agréger [1] ; [4] ; [29] ; [5]. En raison de ce changement structural engendré par la pressurisation, certains sites de coupures spécifiques aux enzymes protéolytiques sont davantage exposés et deviennent donc plus accessibles à l'hydrolyse [11]. Par conséquent, le degré d'hydrolyse (DH) ainsi que la quantité de peptides générés, sont généralement augmentés lors du couplage des HPH et de l'hydrolyse enzymatique. Ce phénomène a été démontré sur diverses sources protéiques pures ou en mélange (ovalbumine, protéines de soya, etc.) [12] ; [14]. Plus spécifiquement, des travaux réalisés sur les protéines du lactosérum ont montré que la β -LG était la protéine sérique la plus sensible à l'action des HPH [44]. Des études menées sur la sensibilité de cette protéine aux HPH ont révélé que des traitements de pressurisation de 200 à 400 MPa pendant 15 à 30 min en présence de diverses protéases digestives (trypsine, pepsine, chymotrypsine, etc.) permettent une hydrolyse enzymatique de l'ordre de 90 à 100% alors qu'un tel résultat est généralement atteint après plusieurs heures à pression atmosphérique [11] ; [12] ; [9]. Plus spécifiquement, à 300 MPa, un taux de dénaturation protéique important a permis de considérablement améliorer l'hydrolyse de la β -LG par la pepsine, hydrolyse quasi-impossible à pression atmosphérique [36]. Plus spécifiquement, Zeece et al. (2008) ont montré qu'un traitement de la β -LG à 400 MPa pendant 10 min n'avait pas d'effet majeur sur l'amélioration du processus d'hydrolyse pepsique, tandis que l'élévation de la pressurisation à 600 et 800 MPa résultait en une digestion rapide de la protéine qui a été complètement dégradée au bout d'une minute. Les composés peptidiques obtenus correspondent à des peptides à courtes chaînes (7 à 10 acides aminés) ainsi que des séquences peptidiques de part et d'autre de la chaîne protéique mère : (Leu₃₂-Leu₅₄ et Phe₈₂-Leu₁₀₄) ; (Leu₁-Leu₁₀) et (Ser₁₅₀-Leu₁₅₆) [64].

Stapelfeldt et al. (1996) ont constaté une augmentation remarquable du rendement en hydrolyse trypsique de la β -LG B, réalisé à 200 MPa. Ces résultats diffèrent cependant des conclusions de Maynard et al. (1998) qui ont montré qu'un prétraitement de la β -LG par les HPH (100 à 800 MPa, 15 min, 40°C) avant hydrolyse trypsique n'a que très peu d'impact sur la dénaturation de la protéine et la modification des profils peptidiques des hydrolysats générés. Cependant, lorsque la pressurisation et l'hydrolyse trypsique sont réalisées simultanément, ces mêmes auteurs ont constaté que l'hydrolyse trypsique de la β -LG augmente drastiquement entre 100 et 400 MPa [65]. Ainsi, l'hydrolyse trypsique de la β -LG pressurisée, sous forme dénaturée et agrégée, génère des intermédiaires d'hydrolyse à longues chaînes: (Val₁₅-Arg₄₀), (Val₄₁-Lys₆₉)S-S(Leu₁₄₉-Ile₁₆₂) et (Val₄₁-Lys₇₀)S-S(Leu₁₄₉-Ile₁₆₂) [66]. Ces intermédiaires ont fait l'objet d'une hydrolyse ultérieure générant des peptides à plus courtes chaînes : (Val₁₅-Tyr₂₀), (Ser₂₁-Arg₄₀), (Val₄₁-Tyr₆₀), (Trp₆₁-Lys₆₉)S-S(Leu₁₄₉-Ile₁₆₂) et (Trp₆₁-Lys₇₀)S-S(Leu₁₄₉-Ile₁₆₂). De plus, les hydrolysats de la β -LG comprenaient plus de séquences peptidiques liées par des ponts disulfures : (Lys₁₀₁-Arg₁₂₄)S-S(Leu₁₄₉-Ile₁₆₂) et (Tyr₁₀₂-Arg₁₂₄)S-S(Leu₁₄₉-Ile₁₆₂). Par conséquent, la dénaturation de la β -LG sous HPH est principalement induite par la déstabilisation des liaisons faibles (hydrophobes et ioniques) et le réarrangement de la structure moléculaire par l'établissement de liaisons SH/S-S, non natives, entre les Cys₁₂₁ et Cys₁₆₀ [66]. Cependant, bien que le couplage des HPH et de l'hydrolyse enzymatique permette d'améliorer globalement le processus de digestion, il est nécessaire de ne pas dépasser des niveaux de HPH ayant un impact négatif sur l'enzyme. En effet, la trypsine conserve 98% de son activité à 300 MPa alors qu'à 400 MPa, une perte d'activité de 25% est observée; cette perte se transforme en une inactivation totale de l'enzyme à des valeurs de pressions supérieures à 400 MPa [1]. Le fait que les HPH augmentent les DH, il en résulte logiquement une modification des profils peptidiques. Dans le cas de la β -LG, certains intermédiaires d'hydrolyse varient d'un point de vue de leur concentration. De plus le ratio peptides hydrophiles/peptides hydrophobes est considérablement modifié. En effet, une concentration plus importante en peptides hydrophobes : (Val₄₁-Lys₇₀)S-S(Leu₁₄₉-Ile₁₆₂), (Val₄₁-Lys₆₉)S-S(Leu₁₄₉-Ile₁₆₂) et (Val₁₅-Arg₄₀), est générée suite à une hydrolyse sous HPH puisque la pressurisation, par dénaturation complète de la protéine, permet l'accès à l'enzyme aux sites de coupure de la cavité hydrophobe [66].

2.3.6. Bioactivité des hydrolysats de β -LG générés sous HPH

2.3.6.1. Bioactivité des protéines alimentaires sous HPH

L'augmentation du DH et les modifications de profils peptidiques observées suite au couplage des HPH et de l'hydrolyse enzymatique ont été très exploitées pour générer des hydrolysats protéiques à bioactivités

améliorées. Ainsi, Quirós et al., (2007) ont montré que l'hydrolyse enzymatique de l'ovalbumine à 400 MPa par la chymotrypsine, la trypsine et la pepsine permettait la libération d'une concentration accrue de peptides à activité antihypertensive [14]. Une étude similaire sur les protéines de pois a révélé qu'un prétraitement à 200 MPa durant 5 min et à 25°C permettait d'augmenter le degré d'hydrolyse en libérant plusieurs peptides de nature hydrophobes et possédant également une activité antihypertensive [15]. Plus récemment, une étude de Girgih et al. (2015) réalisée également sur les protéines de pois a confirmé qu'une hydrolyse par l'Alcalase® sous HPH (200 à 600 MPa) pendant 5 min et à 25°C permettait l'augmentation de la production de peptides à activité antioxydante. Finalement, Garcia-Mora et al., (2015) ont publié des résultats similaires lors de l'hydrolyse enzymatique des protéines de lentilles sous HPH à 300 MPa, avec une augmentation de l'activité antihypertensive et antioxydante des hydrolysats nouvellement générés [67]. En lien avec la valorisation des produits marins, Aléman et al. (2011) ont utilisé les HPH afin d'améliorer l'hydrolyse enzymatique de la gélatine contenue dans la peau des calmars géants (*Dosidicus gigas*). L'utilisation de pressions variant de 100 à 300 MPa, pendant 15 à 30 min en présence d'Alcalase® et de collagénase a permis d'améliorer le pouvoir antioxydant des hydrolysats [68].

L'étude des composés bioactifs dans les hydrolysats tryptiques des protéines sériques, obtenus après pressurisation à 300 MPa, pendant 15 min et à 25°C, a révélé que le traitement sous HPH améliorerait significativement le degré d'hydrolyse ainsi que la concentration en peptides antioxydants [69]. Ces résultats viennent confirmer les observations d'Iskandar et al. (2015) qui, après application d'un traitement à 550 MPa, pendant 1 min et à 20°C en présence de pepsine, ont augmenté le rendement de leurs hydrolysats en peptides bioactifs antioxydants à partir d'un concentré de protéines sériques [70]. Récemment, Hu et al. (2017) ont étudié les propriétés antioxydantes et antihypertensives d'un hydrolysat caséique (α_s -CN), prétraitée sous HPH. Deux cycles de traitement ont été appliqués : 1) des cycles simples à 200 et à 600 MPa pendant 5 et 15 min et 2) des cycles multiples dont 2 cycles à 2,5 min et 3 cycles de 5 min. Les auteurs ont montré qu'une activité antihypertensive plus importante a été détectée à 600 MPa pendant 5 min tandis qu'une activité antioxydante optimale a été obtenue suite au traitement à 600 MPa, pendant 15 min [71].

2.3.6.2. Bioactivité des hydrolysats de la β -LG

Très peu d'études ont porté sur l'amélioration de la bioactivité d'hydrolysats de β -LG suite à une prépressurisation ou à une hydrolyse enzymatique sous HPH de la protéine native. Très récemment, des travaux menés par Bamdad et al. (2017) ont focalisé sur l'hydrolyse enzymatique de la β -LG sous une

pression de 100 MPa en termes de production de peptides à courtes chaînes, connus pour leurs activités anti-inflammatoires et antioxydantes. De ce fait, plusieurs enzymes protéolytiques, Neutrase®, Alcalase®, Savinase®, Elastase®, Thermolysine® et trypsine, ont été testées à leurs conditions optimales de pH et de température et à un ratio E:S de 1:100. Il a été démontré que l'utilisation des HPH a permis de d'efficacement augmenter le pouvoir antioxydant des hydrolysats obtenus. Plus spécifiquement, les hydrolysats produits par l'Alcalase® sous HPH ont démontré un pouvoir antioxydant plus élevé comparativement aux autres hydrolysats. Ces résultats ont été expliqués par les propriétés de l'Alcalase® à rompre spécifiquement les liaisons protéiques des côtés des résidus aromatiques ce qui permet d'augmenter l'hydrophobicité des séquences peptidiques obtenues qui vont s'associer aux radicaux libres. D'autre part, les propriétés de chélation des ions ferriques par les différents hydrolysats enzymatiques obtenus à 100 MPa ont été augmentées de 35% et 16% respectivement pour les échantillons de l'Alcalase® et de la Savinase®, comparativement aux hydrolysats générés à pression atmosphérique. De ce fait, l'accélération du degré d'hydrolyse à 100 MPa a augmenté l'exposition de certains acides aminés ayant la capacité de lier les ions métalliques, notamment l'histidine et la cystéine. L'étude du pouvoir anti-inflammatoire des hydrolysats produit par l'Alcalase® sous HPH a montré une diminution de la capacité de production cellulaire d'oxyde nitrique (ON), molécule générée comme réponse inflammatoire lors d'un stress cellulaire. Ainsi, la combinaison des HPH (100 MPa) et de l'Alcalase® pour l'hydrolyse de la β -LG semble optimale pour augmenter la production de peptides à bioactivités diverses [9].

En conclusion, l'hydrolyse enzymatique sous HPH de diverses protéines alimentaires, incluant la β -LG, s'est avérée très efficace afin d'augmenter les rendements peptidiques et de générer des hydrolysats à bioactivités améliorées. Bien qu'intéressant sur le plan fondamental, il convient, dans une optique d'application des avantages du procédé à HPH à l'échelle industrielle, de pouvoir sélectivement récupérer ces peptides bioactifs afin de les concentrer et d'améliorer davantage leurs propriétés biologiques. Pour réaliser cette opération de manière optimale, l'utilisation des procédés baromembranaires, plus spécifiquement d'UF, s'est avérée efficace pour le fractionnement et la récupération de fractions peptidiques bioactives générées par hydrolyse enzymatique conventionnelle, c'est-à-dire à pression atmosphérique. Les différentes connaissances en lien avec l'utilisation des procédés baromembranaires et de leurs applications pour la séparation d'hydrolysats protéique sont présentées dans les sections suivantes.