

was pre-pressurized at very high pressure.

4.4.3 Performance of the UF process during total recirculation and concentration modes

During the total recirculation mode, both hydrolysate concentrate and permeate were recirculated to the feed tank. Consequently, only the effect of the transmembrane pressure applied to the protein hydrolysate affected the performance of the UF process. Our results clearly demonstrate that UF efficiency decreased during total recirculation of the 400 MPa hydrolysate. Contrary to the 0.1 and 600 MPa conditions, the proportionality between permeate flux and TMP for the 400 MPa condition was lost at a lower TMP value and permeate fluxes were noticeably reduced throughout UF experiments (**Figure 17**). This was associated with a larger accumulation of suspended matter in the polarization layer which induced membrane fouling and, consequently, reduced membrane permeability [111]. Moreover, J_{crit} and J_{lim} which represented the lowest flux that induced irreversible fouling on a filtration membrane [112] and provided information about the cake layer formation [40], respectively, were significantly lower at 400 MPa than for the other conditions, validating the loss of UF performance for this condition.

Previous studies showed that the pH and concentration of the feed, as well as the membrane material, can negatively impacted UF efficiency during UF of tryptic β -LG hydrolysates [88] ; [91] ; [92]. However, except for the pressure applied to the native β -LG, all hydrolysis and filtration experimental parameters were identical. Consequently, only the differences in the peptide profiles and relative peptide abundance could explain the decrease in UF performance during filtration of the hydrolysate generated after pre-pressurization of β -LG at 400 MPa. More specifically, the decline in flux observed at 400 MPa is controlled by concentration polarization since this phenomenon was directly related to the hydrolysate concentration and the peptide profile [91]. Because their peptide profiles were very similar, this could also explain why a similar UF performance was observed for 0.1 and 600 MPa hydrolysates. Finally, differences in composition and peptide relative abundance detected in permeates (**Figure 19**) can be explained by polarization at the membrane surface, which influenced peptide transmission [92] ; [113].

Experiments performed in the concentration mode showed that most peptides with MW lower than or similar to the MWCO of membrane (1 kDa) were recovered in the permeate fraction, confirming that pore size was the main factor that induced peptide transmission. However, some peptides with MW higher than 1 kDa (peaks #4, 14, 18, 19 and 20) were also recovered in the permeate. Nevertheless, as pore size distribution is expressed in terms of Gaussian normal distributions, peptides with

molecular weight higher than the membrane MWCO could migrate through the membrane and be recovered in the permeate fraction [114] ; [43]. The concentration experiments confirmed that hydrolysate generated after pre-pressurization of β -LG at 400 MPa negatively impacted permeate flux. However, while some differences in peptide relative abundance were observed, there is no clear tendency in terms of peptide profile and transmission to explain the decreased UF efficiency during concentration of the 400 MPa hydrolysates. Consequently, and similar to total recirculation mode, the distinctive permeate flux decrease observed between this condition and the two others was probably related to increased accumulation of specific tryptic peptides with greater affinity for PES membrane.

4.4.4 Relative proportion of bioactive peptides in hydrolysates and permeates

Several studies, which combined HHP and enzymatic hydrolysis to improve protein digestion, have demonstrated that pressurization improved the production of bioactive peptides, generally defined as low MW fragments of proteins [115], from many different food proteins [9] ; [14] ; [116] ; [117] ; [98] ; [118] ; [119]. This increased generation of bioactive peptides in pressure-treated hydrolysates was mainly related to the impact of pressurization on protein structure since HHP induced protein unfolding and accelerated protein hydrolysis by exposing new cleavage sites for enzymes. Our study clearly demonstrates that pressurization of β -LG before trypsin hydrolysis improves bioactive peptide production, specifically at 400 MPa because this pressure was probably optimal for protein unfolding and enzyme activity. A recent study demonstrated that enzymatic digestion of β -LG (100 MPa for 2h) with different proteases under pressurization improved the antioxidant and anti-inflammatory activities of pressure-treated hydrolysates due to generation of low-molecular weight and hydrophobic peptides [9]. However, the use of trypsin did not improve the degree of hydrolysis or hydrolysate bioactivities [9].

4.4.5 Characterization of peptide fouling on ultrafiltration membranes

The formation of a fouling layer induced by peptides at the membrane surface is mainly dependent on peptide MW, charge and hydrophobicity [91] ; [88]. The physicochemical parameters of the membrane material also had a significant impact on peptide adsorption [92]. In our study, UF membranes were successively submerged in HNO_3 to desorb electrostatically-linked peptides and in SDoS to desorb hydrophobically-linked peptides [75] ; [108]. We demonstrated that peptide fouling occurred at the membrane surface in all conditions but in different proportions. Only the peptide ALPMHIR, an antihypertensive peptide also known as lactokinine [120], was detected in all tested

conditions (0.1, 400 and 600 MPa) after desorption by SDoS, suggesting that hydrophobic interactions occurred between this hydrophobic peptide and the PES UF membrane. However, since ALPMHIR is positively charged at pH 8, electrostatic interaction with the negatively charged PES material might also occur but to a lesser degree. These results agreed with previous studies which reported a decrease in UF performance due to fouling by hydrophobic peptides. Indeed, Bouhallab and Henry [105] demonstrated that the transmission of hydrophobic peptide (f193-209) generated after chymosin hydrolysis of β -casein was drastically reduced during UF due to hydrophobic interaction with the membrane material [24]. Groleau *et al.* [121] showed that removing hydrophobic peptides from tryptic β -LG hydrolysate potentially reduced the fouling material and improved permeate flux during concentration by nanofiltration [121]. However, our observations contradict those of Fernández *et al.* [88] since these authors suggested that higher adsorption of hydrophobic peptides at the surface of a 1-kDa PES UF membrane after fractionation of tryptic β -LG may be involved in the higher peptide transmission observed [122]. Since the relative abundance of ALPMHIR desorbed from the UF membrane was similar for the 0.1, 400 and 600 MPa treatments, the decrease in UF performance observed at 400 MPa could not be explained only by the formation of a fouling layer induced by this hydrophobic peptide.

The peptides potentially linked by electrostatic interaction to the UF membrane material were higher in number and relative abundance after UF of the hydrolysate generated by pre-pressurization of β -LG at 400 MPa for 10 min, which may explain the loss of efficiency during filtration of hydrolysate in total recirculation and concentration modes. From these peptides, two originating from BSA hydrolysis were probably also involved in the formation of the fouling layer. Since PES was demonstrated as negatively charged, electrostatic interaction may have occurred between the PES material and the positively charged peptides LIVTQTMK (peak #5) and YANKY (peak #7), at the working pH (pH 8). However, the remaining peptides (peaks #4, 9, 13 and 17 (QEPER)) were negatively charged at pH 8 and could not directly interact with membrane material. This tendency was described by Fernández *et al.* [88], who determined that transmission of negatively charged peptides originating from a β -LG tryptic hydrolysate was drastically reduced after their fractionation by UF on a 5-kDa PES membrane, due to the electrostatic repulsion phenomenon [88]. Nevertheless, the lack of agreement of our results with the accepted theory could be explained by a size/charge mechanism. Indeed, the recovery of peptides VAGTWY (peak #9), AEFVEVTK (peak # 13) and QEPER (peak #17), all with a MW less than 1 kDa, suggested that size rather than charge was the predominant factor affecting their transmission. This hypothesis agrees with a previous study which

demonstrated high transmission of the negatively charged peptide ALK (139-141) through a negatively charged 5 kDa PES membrane [88]. This is confirmed by the higher relative abundance of these three peptides in permeates, specifically for the 400 MPa condition (**Figure 19**). The same explanation could apply to peptides TPEVDDEALEK (peak #4) and VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVY (peak #20), even if their molecular weights were higher than 1 kDa, due to their recovery in permeates and because pore size distribution is expressed in terms of Gaussian normal distributions.

4.5. Conclusion

It appeared that pre-pressurization of β -LG at 400 MPa before trypsin hydrolysis modified the peptide profile and improved the peptide yield and generation of bioactive peptides compared to the control and 600 MPa conditions. However, these proteolytic modifications decreased the efficiency of peptide fractionation by the UF process due to increased concentration polarization. It was also observed that peptide fouling occurred, mainly governed by molecular weight and peptide hydrophobicity, particularly for the 400 MPa condition. Moreover, two bioactive peptides (ALPHMIR and VAGTWY) were identified as fouling material. The 400 MPa treatment for 10 min of native β -LG prior seemed to be favorable for subsequent tryptic hydrolysis and bioactive peptide generation. However, it is crucial to optimize the hydrodynamic conditions and/or choose alternative membrane material to maximize the UF performance.

4.6. Acknowledgements

The authors thank Ms. Diane Gagnon (Food Science Department, Laval University) for her technical support. Ms. Sandrine Hugron (Phytology Department, Laval University) is thanked for her assistance in statistical analysis. Davisco Foods International Inc. (Eden Prairie, MN) is acknowledged for providing whey protein standards. The financial support of the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) is gratefully recognized.

Chapitre 5. Discussion générale

Ce projet de maîtrise visait à évaluer l'effet d'un prétraitement de la β -LG par HPH sur les profils peptidiques générés, incluant les peptides bioactifs, et les performances du procédé d'UF utilisé pour leur fractionnement. Dans cette optique, quatre objectifs spécifiques ont été réalisés afin de répondre à l'hypothèse de recherche stipulant que le prétraitement de la β -LG par HPH améliore son hydrolyse trypsique et augmente la production des peptides bioactifs mais que cependant, les modifications de profils peptidiques pourraient éventuellement diminuer les performances du procédé d'UF et accentuer le phénomène de colmatage membranaire.

Le premier objectif visait à caractériser l'ensemble des espèces peptidiques composant les hydrolysats trypsiques de β -LG générés après pré-pressurisation de la protéine native. Une étude préliminaire à cet objectif a permis de valider que, sous HPH (400 et 600 MPa), la β -LG se dénature et forme des agrégats protéiques. Ces agrégats, qui semblaient plus intenses à 600 MPa comparativement à 400 MPa, ont impacté négativement sur l'étape d'hydrolyse trypsique. En effet, la caractérisation des profils peptidiques (0,1, 400 et 600 MPa) par HPLC-MS a montré une efficacité accrue de l'hydrolyse lorsque la pressurisation appliquée était de 400 MPa pendant 10 min comparativement à 600 MPa. En effet, le nombre de peptides générés ainsi que leurs abondances relatives étaient globalement supérieurs à 400 MPa comparativement aux autres conditions de traitement. Par conséquent, cela confirme qu'une pressurisation à 400 MPa a permis de modifier quantitativement et qualitativement la production des peptides à partir de l'hydrolyse trypsique de la β -LG. Par contre, une pressurisation de 600 MPa a au contraire favorisé le phénomène d'agrégation masquant davantage les sites de coupure de l'enzyme diminuant ainsi le processus de digestion. Au niveau des peptides bioactifs générés (antihypertenseurs, antidiabétiques ou antioxydants), 7 ont été détectés dans les hydrolysats. Une nouvelle fois, à 400 MPa, l'abondance relative de ces peptides bioactifs était de 38,64% comparativement à 26,75 et 20,5% à 0.1 et 600 MPa, respectivement. Cela confirme davantage l'efficacité d'un traitement de HPH à 400 MPa pour dénaturer la protéine et améliorer l'hydrolyse trypsique. Cependant, ces résultats ne sont pas totalement en accord avec ceux publiés par Maynard et al. (1998) stipulant qu'un prétraitement de la β -LG par HPH n'a que peu d'effet sur la modification des profils peptidiques. Cependant, les conditions opératoires (ratio E/S, concentration protéique initiale) utilisées par l'auteur étaient différentes de celles appliquées dans ce

projet. Par contre, les travaux de Knudsen et al., (2002) et Chicon et al., (2006) confirment qu'un prétraitement sous HPH améliore l'activité protéolytique des enzymes augmentant ainsi le rendement peptidique.

Le deuxième objectif visait à évaluer les modifications de performance de l'étape d'UF (membrane en PES de 1 kDa) lors du fractionnement des hydrolysats tryptiques pressurisés du fait de la modification de profil peptidique engendré par l'étape de pressurisation. Les premières expériences réalisées en mode recirculation totale ont démontré que les performances du système baromembranaire ont été drastiquement réduites à 400 MPa. En effet, et contrairement aux autres conditions (0.1 et 600 MPa), une diminution importante du flux de perméation a été observé à 400 MPa, et ce dès les premières minutes de filtration. Cette diminution est potentiellement liée à l'augmentation de la couche de polarisation et à la formation d'une couche de colmatage à la surface membranaire. La détermination des flux critiques et flux limites, similaires à 0.1 et 600 MPa (141.1 et 142.9 kg.m⁻².h⁻¹, respectivement pour une PTM de 372 kPa) mais plus faibles à 400 MPa (105,2 et 107,9 kg.m⁻².h⁻¹, respectivement, pour une PTM plus de 323 kPa) permettent de valider l'hypothèse d'un colmatage plus intense à 400 MPa. L'étape d'UF réalisée en mode concentration (PTM de 310 kPa, FCV de 4X) a permis de valider davantage les résultats obtenus en mode recirculation. En effet, à 400 MPa, les flux de perméation étaient une nouvelle fois inférieurs comparativement à ceux calculés à 0.1 et 600 MPa, qui étaient d'ailleurs similaires. Plus spécifiquement, une chute du flux de perméation de 55% a été calculée à 400 MPa alors qu'elle a atteint 43,1% à 0.1 et 600 MPa. Finalement, l'atteinte du FCV de 4 X a été plus long à 400 MPa (durée allongée de 10%) comparativement aux deux autres conditions.

Le troisième objectif visait à caractériser la composition en peptides bioactifs dans les perméats récupérés après UF. Ainsi, et quel que soit le niveau de pression appliquée initialement sur la protéine native avant hydrolyse, 8 peptides représentés par : (pics : 1, 2, 5, 6, 8, 13, 16, 17 et 20) présentaient une abondance relative similaire dans l'ensemble des perméats. Cependant, deux peptides bioactifs, IIAEK (antihypertenseur, pic 3) et TPEVDDEALEK (antidiabétique, pic 4), étaient plus abondants à 400 et 600 MPa par rapport à l'hydrolysat control (0.1 MPa). De plus, l'abondance relative des 7 peptides identifiés comme étant bioactifs dans les perméats a été évaluée à 31,55% à 400 MPa, 24,8% à 0.1 MPa et 24,23% à 600 MPa. Par conséquent, indépendamment de l'impact du traitement à 400 MPa sur les performances de l'UF, cette valeur de pressurisation assure l'obtention

de la meilleure composition d'hydrolysats en termes de peptides bioactifs.

Le dernier objectif visait à déterminer les espèces peptidiques responsables des baisses de performances du système d'UF et du colmatage membranaire. Pour cela, et suite à l'ensemble des étapes d'UF en mode concentration (FCV de 4X), les membranes d'UF ont été récupérées et les peptides potentiellement liés à la surface membranaire ont été désorbés. Ceci dit, un premier trempage des coupons membranaires a été réalisé dans une solution de HNO₃ (récupération des peptides hydrophiles) et SDoS (récupération des peptides hydrophobes). Des analyses HPLC-MS réalisées sur la solution SDoS ont montré que seul le peptide antihypertenseur ALPMHIR, composé majoritairement par des acides aminés hydrophobes, a été détecté à une abondance similaire pour les trois conditions de pressurisation. Il est ainsi possible d'émettre comme hypothèse que ce peptide était lié à la membrane de PES par liaisons hydrophobes. À partir des solutions de HNO₃, 3 séquences peptidiques, LIVTQTMK, AEFVEVTK et YANKY (ou QEPER), ont été identifiées pour les conditions 0.1 et 600 MPa. Une autre séquence peptidique, VAGTWY, présentait une abondance plus importante à 0.1 MPa. À 400 MPa, les mêmes peptides : LIVTQTMK, AEFVEVTK et YANKY (ou QEPER), ont été observés mais en plus forte abondance. De plus, et spécifiquement à 400 MPa, deux autres peptides : TPEVDDEALEK et VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVY ont été identifiés comme espèces colmatantes. Ces peptides ayant des poids moléculaires supérieurs à celui du seuil de coupure membranaire (1 kDa), leur colmatage serait davantage favorisé par une différence de taille alors que l'effet de la charge serait minime.

Chapitre 6. Conclusion générale

À la vue des différents résultats présentés, il est possible confirmer l'hypothèse énoncée initialement et qui stipulait que « la modification du ratio peptides hydrophiles/hydrophobes engendrée lors de l'hydrolyse trypsique de la β -LG sous HPH affecte la transmission et la sélectivité membranaire lors du fractionnement par UF suite à la formation d'une couche de colmatage » Ainsi, nous pouvons conclure que l'utilisation des HPH à 400 MPa est efficace pour améliorer les rendements peptidiques et qu'en plus, l'abondance des peptides bioactifs générés est augmentée. Cependant, cet avantage technologique présente un inconvénient majeur. En effet, les importantes modifications des profils peptidiques observées à 400 MPa sont directement reliées à la baisse des performances de l'étape d'UF réalisée pour concentrer les peptides d'intérêt. Un colmatage membranaire, dû à l'établissement d'interactions peptide-membrane, gouvernées par des effets de charge, de masse et d'hydrophobicité peptidiques, a été particulièrement observée à 400 MPa. Plus spécifiquement, deux peptides identifiés comme bioactifs (ALPMHIR et VAGTWY) ont été récupérés à la surface membranaire. Ainsi, d'un point de vue industriel, les HPH, malgré leurs coûts élevés à l'installation, semblent être une technologie intéressante pour améliorer l'hydrolyse enzymatique et de production de peptides bioactifs. En contrepartie, les performances du procédé d'UF sont diminuées. Par conséquent, et dans une optique d'applicabilité industrielle, il sera nécessaire d'optimiser les performances du procédé d'UF afin d'améliorer les rendements en peptides bioactifs récupérés. Dans cet ordre d'idées, diverses perspectives peuvent être proposées :

- Modifier les paramètres de filtration, notamment le pH, ce qui impactera les charges des peptides générés et par conséquent les interactions peptides-membrane, diminuant ainsi l'adsorption des peptides d'intérêts à la surface membranaire.
- Expérimenter d'autres matériaux membranaires afin de favoriser la transmission des peptides bioactifs tout en minimisant la formation d'une couche de colmatage.
- Utiliser, comme prétraitement avant l'étape d'UF, des résines spécifiques permettant de capter et de concentrer les peptides bioactifs hydrophobes, particulièrement l'ALPMHIR (peptide antihypertenseur), des hydrolysats générés dans cette étude, puis de les désorber en vue de les récupérer sélectivement.
- Tester les perméats générés à 400 MPa (ayant démontré une concentration en peptides bioactifs plus importante) pour leurs propriétés bioactivités via des tests *in vitro* et *in vivo*.